

Tarik Kapić

**Kvantitativna analiza orotske kiseline i značaj u
dijagnostici organskih acidurija i poremećajima
urea ciklusa**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Specijalna područja kliničke biokemije Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra u Zagrebu pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Ksenije Fumić spec. med. biokemije i laboratorijske medicine

Veliko hvala mentorici prof.dr.sc.Kseniji Fumić na ukazanom povjerenju i prilici, uloženom vremenu i brojnim stručnim savjetima pri izradi ovog rada.

Veliko hvala svim djelatnicima Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb na uloženom trudu i strpljenju prilikom prikupljanja podataka korištenih u ovome radu, a posebne zahvale mojoj dragoj Ani Ramljak.

Želim se zahvaliti svojoj baki koja je bila velika podrška svih ovih godina za vrijeme mog studiranja i koja je zajedno sa mnom prolazila sve moje uspone i padove.

Posebno hvala mojim roditeljima i mojoj obitelji koji su bili jedan vrlo jak vjetar u leđa i velika podrška bez koje ja ne bih uspio položiti niti jedan ispit.

Hvala mojim prijateljima, mojoj obitelji koju sam sebi odabrao, koji su vjerovali u mene i kada ja više nisam vjerovao u sebe. Hvala vam na ljubavi, sreći, osmijehu i suzama koje smo zajedno prošli svih ovih godina, a posebno hvala što ste ove godine studiranja učinili najljepšim godinama mog života.

Ovaj diplomski rad želim posvetiti svojim roditeljima, Esmiri i Reufu koji su svih ovih godina bili nesebična podrška i koji su zajedno sa mnom prolazili sve lijepo, ali i ono malo manje lijepo. Hvala vam što ste uvijek vjerovali u mene i što ste uvijek bili ponosni na mene.

Mama i tata hvala vam, voli vas vaš sin Tarik.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. NASLJEDNE METABOLITIČKE BOLESTI.....	1
1.1.1. Laboratorijska dijagnostika nasljednih metaboličkih poremećaja.....	4
1.2. ORGANSKE ACIDURIJE.....	9
1.2.1. Klinička i biokemijska obilježja organskih acidurija	11
1.2.2. Uzorak u dijagnostici organskih acidurija.....	14
1.3. Urea ciklus	16
1.3.1. Poremećaji urea ciklusa	18
1.3.2. Dijagnostika poremećaja urea ciklusa	22
1.4. OROTSKA KISELINA	24
1.4.1. Orotska acidurija.....	26
1.5. PLINSKA KROMATOGRAFIJA-SPEKTROMETRIJA MASA.....	28
1.5.1. Plinski kromatograf	29
1.5.2. Spektrometar masa	31
1.5.3. Vakuum sustav	35
2. CILJ RADA	36
3. MATERIJALI I METODE.....	37
3.1. NAČELO POSTUPKA	37
3.2. ODREĐIVANJE OROTSKE KISELINE PLINSKOM.....	37
KROMATOGRAFIJOM-SPEKTROMETRIJOM MASA	37
3.2.1. Reagensi	37
3.2.2. Otopine	38
3.2.3. Uređaji i pribor	39
3.2.4. Izolacija organskih kiselina iz urina i derivatizacija	39
3.2.5. Radvajanje na kapilarnoj koloni i detekcija	41
3.4. Kratka validacija vlastitih(<i>in house</i>)kvantitativnih analitičkih metoda	42
4. REZULTATI	45
4.2. Validacija kvantitativne analitičke metode	52
5. RASPRAVA	63
6. ZAKLJUČCI	66
7. LITERATURA	67
8. SAŽETAK/SUMMARY	69
Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card	

1.UVOD

1.1. NASLJEDNE METABOLITIČKE BOLESTI

Pojam nasljedni metabolički poremećaj (*engl.inborn errors of metabolism*) u medicinu je 1909. godine uveo Garrod koji je pri tom opisao kliničku sliku alkaptonurije, albinizma i cistinurije. Prema definiciji Europske komisije za javno zdravstvo, takve bolesti su kronične, degenerativne, često i smrtonosne, te se vrlo se kasno dijagnosticiraju. Njihova prevalencija je jednaka ili manja od 1:2 000 ili 5:10 000. Europsko udruženje za rijetke bolesti procjenjuje da postoji oko 5 000 - 7 000 raznih oboljenja koje spadaju u kategoriju rijetkih bolesti i smatra se da 6-8% europske populacije boluje od nasljednih metaboličkih bolesti.

Važno za naglasiti je da se ove bolesti najčešće nasljeđuju prema Mendelovim zakonima nasljeđivanja, recesivno ili dominantno, autosomno ili X-vezano. Vrlo malen broj ih se nasljeđuje mitohondrijski ili maternalnim nasljeđivanjem (to su poremećaji koju nastaju kao posljedice mutacije mitohondrijske DNA).

Do danas je poznato više od 6000 monogenских nasljednih bolesti od kojih je više od 500 nasljednih metaboličkih poremećaja čiji biokemijski mehanizmi nastanka su nam jako dobro poznati i samim tim možemo jako dobro objasniti njihovu patogenezu.

Učestalost monogenских poremećaja je vrlo rijetka, ali ove bolesti predstavljaju veliki problem posebno među bolestima dječije dobi. Smatra se da ti poremećaji zahvaćaju najmanje 1% sve novorođene djece i da su odgovorne za 5% svih hospitalizacija i 8% smrtnih slučajeva u pedijatriji. Prema Galjaardu najveću ustalost imaju autosomno dominantne bolesti (7:1000), autosomno-recesivne(2,5:1000) dok su na posljednjem mjestu X-vezane bolesti (0,4:1000 živorođene djece).

Prema procjenama u Hrvatskoj se godišnje rađa oko 500 djece s nasljednim metaboličkim bolestima, od kojih velika većina ostaje neprepoznata ili se otkrije prekasno. Otkriva se jedva 4-5%,dakle 20-25 djece na godinu, radi čega trostruko više djece nepotrebno umire ili boluje (Huić, 2012).

Važno je napomenuti da se nasljedni metabolički poremećaji mogu pojaviti u svakoj životnoj dobi, ali pravi podatci o učestalosti pojedinih nasljednih metaboličkih bolesti uglavnom ne postoje, osim u zemljama gdje je organizirano selektivno traganje u cijeloj populaciji.

Rezultati takvih selektivnih traganja doveli su do rezultata do vrlo različite učestalosti nasljednih metaboličkih bolesti kod različitih populacija tj. da u nekih regijama i određenim etničkim zajednicama je učestalost određenih bolesti vrlo visoka. Primjerice Gaucherova bolest u Aškenazi Židova ima prosječnu učestalost od 1:1500, dok je u ostaloj populaciji 1:60000 živorodene djece, dok sa druge strane primjerice galaktozemija je bolest koja se u Japanu vrlo rijetko javlja tj. 1:700 000 živorodene djece.

Tablica 1. Približna procjena nasljednih metaboličkih poremećaja u Europi

Cistična fibroza	1:2 000
Fenilketonurija	1:10 000*
Galaktozemija	1:40 000
Cistinoza	1:60 000
Homocistinurija	1:100 000
Bolest javorovog sirupa	1:200 000
Tirozinemija tipa 1	1:200 000

*U Republici Hrvatskoj učestalost fenilketonurije je 1:8200 pri čemu je najviša tendencija u Hrvatskom Zagorju, a najniža u Dalmaciji.

Nasljedne metaboličke bolesti se mogu podijeliti prema vrsti proteina čija je funkcija poremećena i tada se govori o ENZIMOPATIJAMA, bolesti koje nastaju usljed poremećaja transportnih proteina, staničnih receptora, peptidnih hormona, faktora koagulacije i strukturnih proteina. Najbrojniji poremećaji nastaju kao posljedica poremećaja enzima ili strukturnih proteina, bilo da je sinteza strukturno-normalnog proteina smanjena što nazivamo regulacijske mutacije ili da je sinteza proteinske molekule smanjena tj. u potpunosti deficitarna i samim tim funkcija je potpuno onemogućena što nazivamo mutacije usljed defekta strukturnih gena.

Nasljedne metaboličke poremećaje možemo podijeliti prema području metabolizma i funkcionalno ili strukturno promijenjenim organelama na:

- Poremećaje metabolizma ugljikohidrata
- Poremećaje metabolizma aminokiselina (AMINOACIDOPATIJE)
- Organske acidruije
- Poremećaje ciklusa ureje
- Poremećaje metabolizma masnih kiselina i karnitina

- Peroksisomske bolesti
- Lizomoske bolesti nakupljanja
- Poremećaje stvaranja energije u mitohondrijima
- Poremećaje metabolizma purina i pirimidina

Nasljedne metaboličke bolesti patofiziološki možemo podijeliti u tri skupine:

1. **SKUPINU** čine nasljedne metaboličke bolesti sa akutnim tijekom ili vrlo progresivne intoksikacije zbog različitih poremećaja u metabolizmu aminokiselina, organskih kiselina, mono- ili disaharida tj, **poremećaji metabolizma malih molekula.**

Poremećaji iz ove skupine karakterizirani su blokadom normalnog metaboličkog puta što za posljedicu ima nakupljanje toksičnih spojeva i znamo da većina aminoacidopatija (homocistinurija), organskih acidurija (mevalonska i glutarična acidurija tipa 2), nasljedni poremećaji ciklusa ureje i intolerancija šećera pripadaju ovoj skupini poremećaja.

Klinička slika je vrlo promjenljiva pri čemu varira od asimptomatskih perioda do perioda sa kliničkim znakovima akutne intoksikacije (pri čemu dolazi do povraćanja, letargije, kome, poremećaja jetrene funkcije) preko perioda kronične intoksikacije koja je karakterizirana progresivnim zaostajanjem u psiho-fizičkom razvoju i naravno tu su ponavljajući metabolički poremećaji kao što su acidoza, ketoza i hiperamonijemija.

2. **SKUPINU** čine poremećaji sinteze ili razgradnje velikih molekula (glikoproteini, glikolipidi, mukopolisaharidi) koje predstavljaju kronične poremećaje sa trajnim i vrlo progresivnim simptomima. U ovu skupinu ubrajamo:
 - Lizosomske bolesti nakupljanja u kojima zbog različitih poremećaja enzimskih funkcija dolazi do nakupljanja i taloženja složenih molekula
 - Poremećaji biogeneze peroksisoma u kojima je poremećena u kojima je poremećena biosinteza plazmalogena, kolesterola i žučnih kiselina ili beta-oksidacija masnih kiselina vrlo dugih lanaca.
 - Poremećaji unutarstaničnog prometa i procesiranja proteina poput deficita alfa1-antitripsina i nasljednih poremećaja glikozilacije.

3. **SKUPINU** čine poremećaji koji nastaju usljed energetske deficijencije koje nastaju kao posljedica u poremećaju stvaranja ili iskorištavanja energije koja je nastala metabolizmom u jetri, srčanom mišiću, skeletnim mišićima ili mozgu (glikogenoze, poremećaji glukoneogeneze, poremećaji oksidacije masnih kiselina i respiratornog lanca)

Simptomi koje imaju pacijenti ove skupine su zajednički: hipoglikemija, hipotonija, hiperlaktacidemija, miopatija, kardiomiopatija, zaostajanje u razvoju.

1.1.1. Laboratorijska dijagnostika nasljednih metaboličkih poremećaja

Klinička slika na prvi pogled rijetko upućuje na nasljednu metabolički poremećaj jer u većini poremećaja simptomi su vrlo nespecifični i poklapaju se sa simptomima sepse, težih infekcija, bolesti središnjeg živčanog sustava, srca ili probavnog sustava, akutnog ili kroničnog trovanja. Liječnik ukoliko posumnja na neki od nasljednih metaboličkih poremećaja može tražiti specijalne biokemijske pretrage, ali kod određenih bolesti dijagnostika je nemoćna i one se teško prepoznaju sve dok ne dođe do težih oštećenja, ali se to može spriječiti sustavnim traganjem u ranoj novorođenačkoj dobi.

1.1.1.1. Sustavno traganje

Sustavno traganje podrazumijeva ispitivanje cjelokupne novorođenačke populacije određene zemlje ili regije tj. nasljedne metaboličke poremećaje koje je moguće liječiti, a klinički ih je teško dovoljno rano prepoznati. Takav oblik laboratorijske dijagnostike uveo je Robert Guthrie 1963. kada je osmislio test inhibicije bakterijskog rasta za fenilketonuriju.

Da bi određena bolest ušla u nacionalni program sustavnog traganja mora zadovoljiti stroge kriterije:

- dovoljno visoka učestalost u populaciji
- nemogućnost rane kliničke dijagnoze
- mogućnost samog liječenja nakon ranog otkrivanja

-postojanje brzog, specifičnog i osjetljivog testa dokazivanja, bez lažno negativnih rezultata.

-povoljan odnos troškova programa sustavnog traganja prema ekonomskoj koristi ranog otkrivanja i liječenja.

U Republici Hrvatskoj se od 1978. godine provodi sustavno traganje na fenilketonuriju, a od 1985. godine i na kongenitalnu hipotireozu. Ovisno o financijskim mogućnostima i učestalosti u određenoj regiji, u pojedinim državama u sustavno traganje uključene su i galaktozemija, bolest javorovog sirupa, homocistinurija, cistična fibroza, Tay-Sachsova bolest.

Zahvaljujući razvitku tehnologije sustavno traganje je znatno unaprijeđeno pa je tako primjenom tandem masene spektroskopije (MS-MS) omogućeno istovremeno traganje za više od 20 metaboličkih poremećaja. Analizom acilkarnitina i aminokiselina u istom uzorku suhe kapi krvi (Guthrieve kartice) moguće je otkriti:

1. Poremećaje beta oksidacije masnih kiselina:

- nedostatak acil-CoA dehidrogenaze kratkih lanaca
- nedostatak acil-CoA dehidrogenaze srednjih lanaca
- nedostatak acil-CoA dehidrogenaze vrlo dugih lanaca
- višestruki nedostatak acil-CoA dehidrogenaza
- nedostatak 3-hidroksilacil-CoS dehidrogenaze
- nedostatak acilkarnitin-translokaze

2. poremećaj katabolizma aminokiselina razgranatog lanca:

- metilmalonska acidemija
- propionska acidemija
- izovalerijanska acidemija
- nedostatak 3-oksotiolaze
- 3-hidroksil-3-metil-glutarna acidurija

te naravno

- glutarna acidurija tipa 1
- fenilketonurija
- bolest javorovog sirupa
- tirozinemija
- hiperglicinemija

1.1.1.2. *Selektivno traganje*

Selektivno traganje se odnosi na bolesti koje se očituju akutnom metaboličkom krizom i upućuje na prisutnost metaboličke acidoze, hipoglikemije, hiperamonijemije, ketoze ili laktacidoze. Najčešće su to poremećaji malih molekula kod kojih dolazi do nakupljanja toksičnih međuprodukata pa je od velikog značaja njihovo uklanjanje, pravodobni nadomjestak energije i uvođenje pravilne prehrane.

Samo selektivno traganje počinje uobičajnim, vrlo jednostavnim pretragama u urinu poput provjere boje i mirisa urina ili pretrage sa dinitrofenilhidrazinom za dokazivanje okso kiselina itd. U daljnjoj diferencijalnoj dijagnostici potrebno je izmjeriti laktat, piruvat, amonijak, aminokiseline, organske kiseline, karnitin, 3-hidroksi maslačnu kiselinu, acetoacetat itd.

U samoj dijagnostici nasljednih metaboličkih poremećaja kroničnog tijeka potrebno je u prvoj fazi provesti osnovne metaboličke i dijagnostičke pretrage zbog vrlo slične kliničke slike jer takav pristup omogućuje isključivanje određenih poremećaja i sužuje izbor samih pretraga.

Primjerice, u slučaju kliničke sumnje na neku od lizosomskih bolesti nakupljanja potrebno je izmjeriti izlučivanje mukopolisaharida u uzorku 24-satnog urina i odrediti vrste izlučenih mukopolisaharida, oligosaharida i sfingolipida tankoslojnom kromatografijom.

1.1.1.3. Tijek laboratorijske dijagnostike kod sumnje na nasljedni metabolički poremećaj

U ovisnosti promatramo li akutni ili kronični metabolički poremećaj rade se različite pretrage.

1. OSNOVNE METABOLIČKE PRETRAGE (tablica 2.)

AKUTNI TIJEK	KRONIČNI TIJEK
-urin: Boja i miris Metilketoni Reduktivne tvari Reakcija sa feri-kloridom Brandonova reakcija Reakcija sa sulfitom -Krv, plazma, serum: Acidobazna ravnoteža Elektroliti Amonijak Laktat, piruvat, glukoza aminotransferaze	-Plazma/serum: Aminotransferaze Kreatinin Urat Kolesterol i trigliceridi Ukupni proteini i elektroforeza Razmaz periferne krvi -Biokemijska obrada likvora

2. SKUPNO SPECIFIČNE DIJAGNOSTIČKE PRETRAGE (tablica 3.)

AKUTNI TIJEK	KRONIČNI TIJEK
Aminokiseline (S, U, L) Organske kiseline (S, U, L,) Acilkarnitini (U, S, suha kap krvi) Mono- i dissaharidi (U)	Oligosaharidi (U) Mukopolisaharidi (U) Cerebrozidi,sulfatidi (U) Masne kiseline vrlo dugih lanaca (S, P) Purini,pirimidini (U) Porfirini (U) Neurotransmiteri (U,L)

3. DODATNE DIJAGNOSTIČKE PRETRAGE (tablica 4.)

<i>AKUTNI TIJEK</i>	<i>KRONIČNI TIJEK</i>
Ukupni i slobodni karnitin (S, U) 3-OH butirat i acetoacetat (K) Slobodne masne kiseline (S, P) Galaktoza (S, U) Orotska kiselina (U) Metilmalonska kiselina (U) „in vivo“ funkcijski testovi(opterećenje glukozom,fruktozom,fenilalaninom, alopurinolom,karnitinom,test gladovanja)	Fitanska i pristanska kiselna (S) Pipekolična kiselina (S, U) Zadržavanje katalaze (fibroblasti) Žučne kiseline (S) Genetičke komplementacijske analize (fibroblasti) Elektroforeza transferina i izoelektrično fokusiranje(S)

4. PRETRAGE POTVRDE (tablica 5.)

<i>AKUTNI TIJEK</i>	<i>KRONIČNI TIJEK</i>
Enzimski: Leukociti Biopsi mišića i jetre Kulture stanica	nDNA i mDNA: krv tkivo

S-serum;U-urin;P-plazma;L-likvor

1.1.1.4. *Prenatalna dijagnostika*

Preduvjet za provođenje prenatalne dijagnostike za nasljedne metaboličke poremećaje jest poznata dijagnoza bolesnika u obitelji. Kao uzorci za prenatalnu dijagnostiku mogu se koristiti serum majke, fetalne stanice u krvi majke (trofoblasti i eritroblasti), amnijska tekućina i kultura amniocita, korionske resice, kultura stanica korionskih resica i fetalno tkivo (jetra i koža).

Amnijska tekućina je vrlo čest biološki materijal za prenatalnu dijagnostiku pri čemu se dobije ranom amniocentezom koja se provodi između 15. i 17. tjedna gestacije i smatra se relativno sigurnom i jednostavnom (rizici za trudnoću i fetus <0,5%)

Uzimanje korinskih resica provodi se između 10. i 12. tjedna gestacije, što omogućuje dobivanje nalaza u prvom tromjesečju, ali je rizik za fetus i trudnoću 2-4%.

1.2. ORGANSKE ACIDURIJE

Organske acidurije su heterogena skupina nasljednih metaboličkih poremećaja i karakterizirane su nakupljanjem jedne ili više organskih kiselina u tjelesnim tekućinama, posebice u urinu. Od 1980. godine poremećaji metabolizma organskih kiselina ubrajaju se u skupinu najčešćih akutnih, životno opasnih nasljednih poremećaja metabolizma, a razvojem tehnologije i dijagnostike u proteklih 40 godina došlo je do povećanja otkrića novih poremećaja kao i novodijagnosticiranih bolesnika. Danas je poznato više od 60 različitih poremećaja i njihovih podtipova i sama učestalost ovih bolesti je 2:10 000 živorođene djece.

Organske kiseline su spojevi sa jednom ili više karboksilnih ili kiselih fenolnih skupina koje ne sadrže bazične amino skupine i ne reagiraju sa ninhidrinom i dobro su topljive u vodi i mogu sadržavati različite funkcionalne skupine kao što su hidroksilne, okso, amidne, nezasićene alifatske, aromatske ili tiolne skupine koje, u pravilu, ne povećavaju polarnost molekula toliko da bi spriječile njihovu ekstrakciju organskim otapalom iz vodene sredine.

Poremećaji organskih kiselina nastaju u mnogim metaboličkim putovima, a najveći broj je posljedica razgradnje aminokiselina, mitohondrijskog metabolizma uključujući beta-oksidaciju masnih kiselina te poremećaja ketolize. Većinom su prouzrokovane nasljednim enzimskim defektom ili nedostatkom, ali mogu biti i stečene usljed enzimske inhibicije određenim toksinima ili pak nedostatnog unosa enzimskog kofaktora hranom. Spojevi koji se izlučuju mogu biti normalni metabolički intermedijeri čija se prisutnost u urinu zdravog čovjeka ne može dokazati ili se kao takvi izlučuju u tragovima, ali sa druge strane to mogu biti metaboliti koji su nastali sekundarnim, alternativnim metaboličkim putovima uslijed blokade u glavnom metaboličkom putu. Osim endogenog, mogu biti i egzogenom podrijetla: iz hrane, različitih dodataka hrani, lijekova ili proizvodi metabolizma bakterija. U ekstraktu organskih kiselina mogu biti prisutni spojevi poput pirimidina ili orotska kiselina koja upućuje na poremećaj urea ciklusa o kojoj će biti riječi u daljnjem nastavku ovoga rada.

Samom analizom organskih kiselina u biološkim tekućinama, prvenstveno u urinu, dobivamo uvid u fiziološki i patofiziološki status različitih metaboličkih putova kao i njihove međuodnose.

Razlikujemo poremećaje metabolizma koji rezultiraju organskim acidurijama:

1. POREMEĆAJ METABOLIZMA AROMATSKIH AMINOKISELINA:

Fenilketonurija, tirozinemija tipa 1 i tipa 2, Hawkinsinurija, alkaptonurija

2. POREMEĆAJI AMINOKISELINA RAZGRANATIH LANACA:

Bolest javorovog sirupa, nedostatak dihidrolipoil-dehidrogenaze, izovalerijska acidemija, 3-metilkrotonilacidurija, 3-metilglutakonična acidurija, 3-hidroksi-3-metilglutarna acidurija, mevalonska acidurija, 2-metilbutirilglicinurija, nedostatak 3-oksotiolaze, nedostatak 2-metil-3-hidroksibutiril-CoA dehidrogenaze, propionska acidemija, nedostatak izobutiril-CoA dehidrogenaze, 3-hidroksiizomaslačna acidemija, metilmalonska acidemija, metilmalonska acidemija sa homocistinurijom, malonska acidurija.

3. POREMEĆAJ METABOLIZMA DIBAZIČNIH AMINOKISELINA:

Glutarna acidurija tipa 1, 2-oksodipinska acidurija, hiperornitinemija-hiperamoniemija-homocistinurija (HHH) sindrom, lizinurična nepodnošljivost proteina.

4. POREMEĆAJI GAMA-GLUTAMILNOG CIKLUSA:

5-oksoprolinurija (piroglutaminska acidurija), nedostatak 5-oksoprolinaze

5. POREMEĆAJI UREA CIKLUSA:

Nedostatak ornitin karbamiltransferaze, cistrulinemija, argininemija

6. POREMEĆAJI METABOLIZMA PIRIMIDINA:

Orotska acidurija, nedostatak dihidropirimidin-dehidrogenaze, nedostatak dihidropirimidinaze, nedostatak ureidopropionaze

7. POREMEĆAJI OKSIDACIJE MASNIH KISELINA:

VLCAD, MCAD, SCAD, LCHAD, SCHAD, nedostata trifunkcionalnog proteina, nedostatak 3-oksotiolaze srednjih lanaca, glutarna acidurija tipa 2 ili višestruki nedostatak acil-CoA-dehidrogenaza i etilmalonska-adipinska acidurija.

8. OSTALI POREMEĆAJI

4-hidroksimaslačna acidurija, Canavanova bolest, fumarna acidurija
2-oksoglutarina acidurija, hiperoksalurija, D-glicerična acidurija, glicerolurija, nedostatak dekarboksilaze aromatskih L-aminokiselina, ksantinurija, laktacidoze.

1.2.1. Klinička i biokemijska obilježja organskih acidurija

Organske acidurije su se nekad smatrale malom skupinom bolesti karakterizirane metaboličkom acidozom uslijed nakupljanja većih količina kiselih metabolita, vrlo progresivnim pogoršanjem, prvenstveno neurološkog statusa i smrću u prvim danima ili tjednima života dok se danas zna da se organske acidurije očituju šarolikom i vrlo nespecifičnom kliničkom slikom i biokemijskim nalazima.

Kod novorođenčadi i dojenčadi organske acidurije se očituju simptomima akutne i neobjašnjive sistemske intoksikacije ili akutnom encefalopatijom. Novorođenče se obično nekoliko sati po porodu čini zdravim, ali ubrzo pri početku hranjenja nastupa period ozbiljne bolesti, obično sa metaboličkom acidozom, povišenom anionskom razlikom, hipoglikemijom, hiperamonijemojom i ketonurijom. Visoka hiperamonijemija uzrokuje hiperventilaciju pa respiratorna alkalozna može prikriti metaboličku acidozu.

Samo stanje djeteta postaje sve lošije, dijete se teško budi za obroke, slabo siše, ne napreduje, sklono je hipotermiji nepravilnom disanju i bradikardiji te ukoliko se ne liječi nastupa koma izazvana nakupljanjem toksičnih metabolita i smrt.

Blaži oblici bolesti mogu se pojaviti kasnije tijekom života, obično u vrijeme interkurentnih infekcija sa sličnom simptomatologijom kao i kod novorođenčadi sa učestalim povraćanjem i nenapredovanjem također tu je i čitav niz drugih poremećaja od akutnog pankreatitisa do respiracijskog zastoja.

U sljedećim tablicama je prikaz anamnestičkih, kliničkih i biokemijskih pokazatelja čija prisutnost upućuje na potrebu selektivnog traganja na organske acidurije.

Tablica 6. Anamneza koje upućuje na organski aciduriju

- srodstvo roditelja
- stroga vegetarijanska prehrana majke u trudnoći i za vrijeme dojenja
- jetrene bolesti majke u trudnoći
- izbjegnuta nagla dojenačka smrt braće i sestara
- početak bolesti nakon uredne trudnoće i poroda u kratkom periodu nakon početka hranjenja
- krize vezane uz gladovanje, stres i infekcije
- odbijanje hrane, i
- progresivni tijek

Tablica 7. Status koji upućuje na organsku aciduriju

- Reyeov sindrom
- dispneja ili apneja
- miopatija ili/i kardiopatija
- recidivno povraćanje
- tvrdokorni proljevi
- nenapredovanje
- znakovi jetrene bolesti
- hepatosplenomegalija
- kronični ili recidivni pankreatitis
- poliurija
- urolitijaza
- sklonost infekcijama
- poremećaj u razvoju govora

Tablica 8. Neurološka obilježja koja upućuju na organsku aciduriju

- poremećaji svijesti različite dubine (hipotonija, letargija, koma)
- mentalna retardacija
- recidivne konvulzije, refraktorne na terapiju
- hipotonija
- distonija, diskinezija
- progresivna periferiarna neuropatija
- vaskularni inzult

Tablica 9. Biokemijski pokazatelji organskih acidurija

- neobjašnjiva metabolička acidoza
- povećana anionska razlika
- hipoketotična hipoglikemija
- ketoza i ketonurija
- laktacidoza
- hiperamonijemija
- hiperurikemija
- hipertrigliceridemija i povišene slobodne masne kiseline
- granulocitopenija i trombocitopenija

Tablica 10. Karakterističan miris bolesnika u organskim acidurijama

<i>Poremećaj</i>	<i>Spoj</i>	<i>Miris</i>
Bolest javorovog sirupa	1. 2-oksoizovalerijanska kiselina 2. 2-oksoizokaproična kiselina i 2-okso-3-metilvalerijsna kiselina	1. Curry 2. javorov sirup(karamel)
Izovalerijanska acidemija	Izovalerijanska kiselina	miris znojnih stopala
3-hidroksi-3-metilglutarna acidurija	-	miris znojnih stopala
Glutarna acidurija tip 2	-	miris znojnih stopala
3-metilkrotonilglicinurija	3-hidroksiizovalerijanska kiselina	mačji urin
Višestruki nedostatak karboksilaa	3-hidroksiizovalerijanska kiselina	mačji urin
Metilmalonska acidemija	Metilmalonska kiselina	miris po kiselini
Fenilketonurija	Feniloctena kiselina	plijesan, miševi
Tirozinemija tipa 1	2-hidroksimaslačna kiselina	poput kupusa, kelja

1.2.2. Uzorak u dijagnostici organskih acidurija

1.2.2.1. Urin

Većina pretraga vezanih uz organske acidurije se provodi u urinu jer se najveći broj poremećaja održava izlučivanjem karakterističnih metabolita, a urin je također vrlo lako dostupan uzorak osobito kod novorođenčadi i dojenčadi. Najčešće se koristi slučajan uzorak, premda prednost uvijek ima prvi jutarnji uzorak, posebice kod poremećaja razgradnje aminokiselina i oksidacije masnih kiselina jer je koncentriraniji pa se i ovi poremećaji jasnije očituju. Može se koristiti i 24h urin.

Preporuča se uzorkovanje bez dodatka konzervansa, pohrana na +4°C za kratko vrijeme, odnosno na -20°C za duži period do same analize. Uzorak se šalje smrznut na suhom ledu u metabolički laboratorij, a ukoliko to nije moguće može se dodati nekoliko kapi kloroforma na 5-10 ml urina (*Maradin,2001*).

U ekstraktu urina mogu pored organskih kiselina biti prisutna i različita onečišćenja koje potječu iz posuda u koje se urin uzorkovao ili od bakterijskog zagađenja ili iz hrane. Bakterije mogu, ovisno o metabolizmu, potrošiti organske kiseline karakteristične za neki poremećaj ili vlastitom sintezom prikriti neke poremećaje. Povišeno ili smanjeno izlučivanje laktata te 2-oksoglutarata i sukcinata najčešće je posljedica zagađenja bakterijama i može se interpretirati kao mitohondrijski poremećaj.

Tablica 11. Onečišćenja pri analizi organskih kiselina u urinu

<i>Podrijetlo</i>	<i>Organska kiselina ili neki drugi spoj</i>
Prehrana	adipinska, furoična kiselina ili tartarat
prehrana srednjelančanim trigliceridima	sebakična>suberična>adipinska 7-hidroksioktanoična kiselina
lijekovi: 1. paracetamol 2. valproati	1. pirolglutaminska kiselina 2. brojni metaboliti (2-propilglutarat, valproil-glukuronih)
otrovanje etilenglikolom	Etilenglikol, glikolna, okslana, benzojeva, glutarna kiselina
bakterijsko zagađenje	3-hidroksipropionska, 2-oksoglutarina, jantarna, 4-hidroksifenilacetna kiselina, D-laktat, fenilpropionilglicin, uracil
zagađenje sapunom	<u>palmitinska i stearinska kiselina</u>
zagađenje uljima	Glicerol

1.2.2.2. Ostale biološke tekućine

Plazma, likvor, očna vodica mogu se koristiti u slučaju smrti djeteta sa sumnjom na nasljedni metabolički poremećaj ukoliko naravno nije skupljen urin.

Analiza organskih kiselina u likvoru može biti korisna u tkz. cerebralnim organskim acidurijama: nedostatak glutaril-CoA dehidrogenaze i poremećajima metabolizma biotina jer kod tih poremećaja izlučivanje organskih kiselina urinom može biti normalno.

Krv uzeta na heparin, bez staze, nakon gladovanja preko noći odmah se centrifugira na $+4^{\circ}\text{C}$, odvoji se plazma i smrzava se na -20°C do analize. Serum kao uzorak se ne preporuča zbog promjena u koncentraciji i sastavu organskih kiselina tijekom perioda zgrušavanja. Likvor se zamrzava, ako je moguće još kraj kreveta bolesnika na suhom ledu i čuva na -80°C do analize.

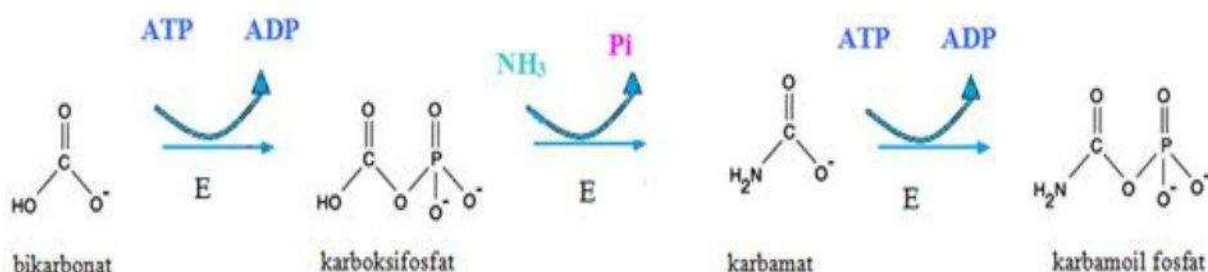
Amnijska tekućina koristi se u prenatalnoj dijagnostici.

Bez obzira koji se biološki materijal šalje u laboratorij na analizu, potrebna je potpuna klinička informacija o kliničkom statusu bolesnika, prehrani te lijekovima i bez tih podataka nemoguće je pravilno interpretirati spektar izlučenih kiselina.

1.3. Urea ciklus

Ciklus ureje je važan metabolički ciklus, osobito za sisavce, jer oni putem urea ciklusa izbacuju višak amonijaka iz organizma koji ima toksično djelovanje i to na način da amonijak prevodi u ureu i to sve u svrhu sprječavanja hiperamonijemije koja može dovesti do jetrene encefalopatije i u konačnici do neuropsihijatrijskih poremećaja.

Urea ciklus se sastoji od 5 reakcija. Prva u nizu se događa u mitohondriju i predstavlja regulacijski korak u ureja ciklusu. Za njezino odvijanje potreban je mitohondrijski enzim **karbamoilfosfat sintetaza I (CPS I)** koji katalizira niz od tri koraka kao što je to označeno na **Slici 1**.

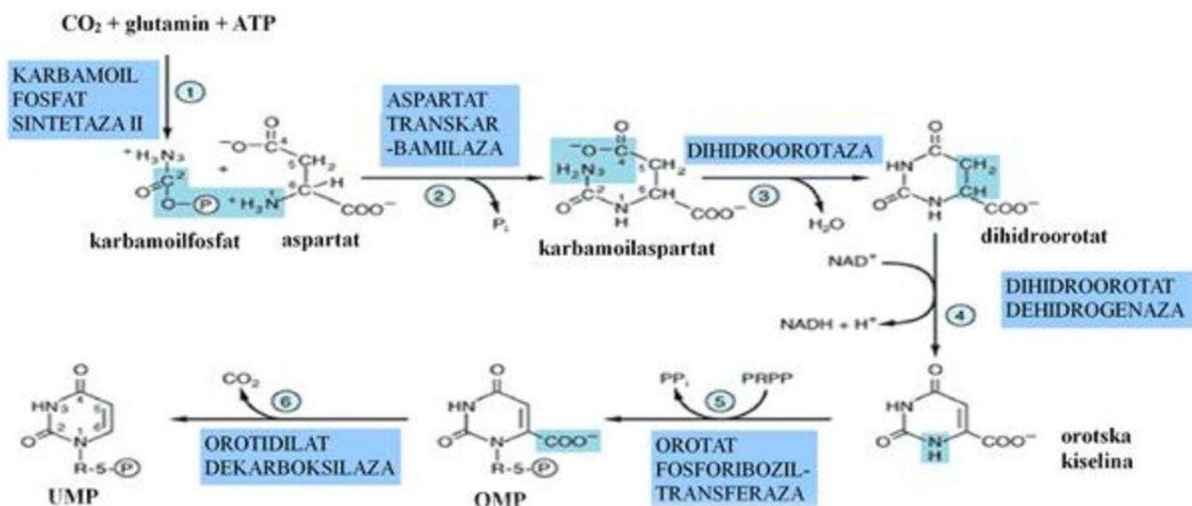


Slika1. Sinteza karbamoil fosfata E:karbamoil fosfat sintetaza (preuzeto i prilagođeno sa www.preepetumlab.hr)

Važno za naglasiti jeste da postoji i enzim karbamoil fosfat sintetaza 2 koja je citoplazmatski enzim, i sudjeluje u prvom koraku sinteze pirimidina te koristi glutamin

kao izvor amonijevih iona. Kao jedan od produkata u ovom biosintetskom putu nastaje i orotska kiselina. U poremećajima ciklusa ureje dolazi do povećanja koncentracije orotske kiseline u urinu zbog povećane razine glutamina u krvi koji predstavlja izbor amonijaka u ovom biosintetskom putu. Kod manja ornitin transkarbamilaze dolazi do nakupljanja karbamoil fosfata koji se onda koristi za sintezu pirimidina, te dovodi do povećanja koncentracije oritidina i orotske kiseline.

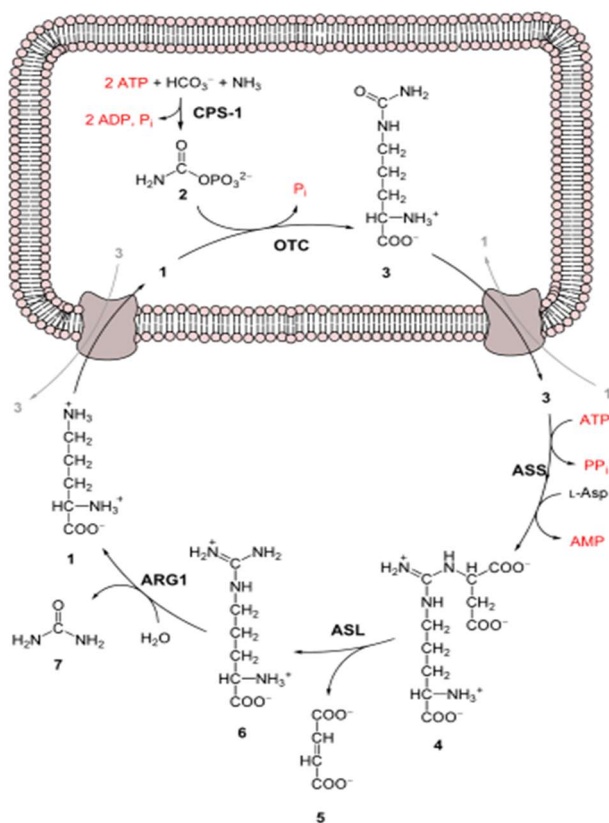
Sinteza pirimidina i nastanak orotske kiseline prikazan je na slici 2.



Slika 2. De novo put sinteze pirimidinskih nukleotida (preuzeto i prilagođeno prema Stryeru, 2012).

Kada nastane karbamoilfosfat, on se spaja s ornitinom, te nastaje citrulin. Ta se reakcija zbiva u mitohondriju djelovanjem enzima ornitin transkarbamilaze (OTC). U zamjenu za ornitin, citrulin se putem specifičnog transportera prenosi iz mitohondrija u citoplazmu. Nakon što dospije u citosol, spaja se sa aspartatom čime nastaje argininosukcinat. Reakciju katalizira enzim argininosukcinat sintetaza (ASS) uz pomoć ATP-a i dodatne hidrolize pirofosfata. U četvrtom reakcijskom koraku enzim argininosukcinaza (ASL) cijepa argininosukcinat, pri čemu nastaju arginin i fumarat. Arginin je važna aminokiselina, a fumarat međuprodukt ciklusa ureje i ciklusa trikarbonskih kiseline. Valja reći kako je ovo jedina reverzibilna reakcija ciklusa ureje. Nastala aminokiselina arginin sadrži dušikove atome koji potječu iz različitih izvora, iz ornitina, aspartata i slobodnog amonijeva iona. Djelovanjem enzima arginaze (ARG), odcjepljuje se ureja od molekule arginina, i ponovno nastaje ornitin, koji pomoću svojeg

transportera ulazi ponovno u mitohondrij, te tada može započeti novi ciklus.



Slika 3. Cjelokupni prikaz urea ciklusa (preuzeto i prilagođeno sa www.wikipedia.com)

1.3.1. Poremećaji urea ciklusa

1.3.1.1. Deficit ornitin transkarbamilaze

Jedan od poremećaja urea ciklusa, a za ovaj rad i najznačajniji, jeste potpuni deficit ili djelomično izmjenjena funkcija ornitin transkarbamilaze(OTC).

Enzim koji ima tri podjedinice strukturno vrlo slične, veličine do 38kDa i kao takav sintetizira se u citosolu, ali se transportira u mitohondrij putem N-terminalnog signalnog peptida kojeg prepoznaju receptori sa vanje strane mitohondrija.

Gen za enzim se nalazi na X-kromosomu te ukoliko dođe do određenih tločkastih mutacija u genu, gdje primjerice arginin na poziciji 109 se zamijeni sa glutaminom ili stop kodonom nastaje neefikasan protein što za posljedicu ima smanjenje enzimске aktivnosti ili stvaranje potpuno nefunkcionalnog enzima i naravno što za posljedicu ima ozbiljne i teške kliničke slike.

Dječaci su hemizigoti za ovu bolest, imaju samo jedan X kromosom, pa je kod njih bolest češća i s težim posljedicama. Djevojčice su homozigoti ili heterozigoti za navedeno oboljenje, s obzirom da posjeduju dva X kromosoma. No čak i

asimptomatske djevojčice, heterozigoti za ovu bolest, mogu imati niži IQ od normalnog i težu kliničku sliku u slučaju da je proporcija stanica koje sadrže inaktivirani normalni X kromosom veća od stanica koje sadrže inaktivirani X kromosom s mutiranim genom (Nyhan i sur., 2005).

U ovisnosti da li je riječ o muškom ili ženskom novorođenčetu tj. u ovisnosti koliko je OTC deficitaran razlikujemo naravno i različite simptome. Kod muških novorođenčadi bolest najčešće nastupa par dana nakon rođena gdje dijete prestaje jesti, javlja se letargija i razdražljivost. Ukoliko se brzo ne prisupi liječenju takve djece nastupa jetrena encefalopatija koja vodi do kome i u konačnici do smrti. Prognoza samih pacijenata ovisi isključivo o samom trajanju hiperamonijemije, koja nastaje kao posljedica nedostatka OTC enzima, ali se naravno može adekvatno liječiti.

Važno je naglasiti da postoji i latentni oblik deficita orinit transkarbamoilaze (OTC) koji se smatra blažim oblikom metaboličkog poremećaja od samog infantilnog oblika, ali osobe koje imaju ovakav poremećaj u jednom periodu svoga života dožive ozbiljna stanja hiperamonijemije što zapravo uveliko ovisi od njihovog načina života i ukoliko se pravovremeno liječnički ne intervenira može preći u jedno životno opasno stanje. Oni se najčešće javljaju zbog problema sa glavoboljom, mučninom, povraćanjem ili različitim psihijatrijskim simptomima (zbunjenost, agresivnost ili problem sa samoozljeđivanjem).

Sama dijagnostika deficita enzima uključuje prvenstveno određivanje aminokiselina u plazmi i urinu, organskih kiselina u urinu (prvenstveno **orotske kiseline**) kao i određivanje acilkarnitina (vrlo često su vrijednosti normalne kod ovog poremećaja, ali su vrlo korisni zbog mogućih drugih uzroka hiperamonijemije).

Za pacijenta koji ima neliječeni deficit orinitin transkarbamoilaze karakteristična je smanjena koncentracija citrulina i arginina, kao i povećana koncentracija **orotske kiseline** u urinu, koja je rezultat nakupljanja karabamoil fosfata. Ovakav biokemijski fenotip, povećana razina amonijaka i orotske kiseline, a smanjena razina citrulina je karakteristična za pacijente koji imaju OTC deficit, ali je vrlo često prisutna kod neonatalnih pacijenata sa deficitom **ornitin aminotransferaze**.

Kod dijagnostike manjka ornitin transkarbamilaze, preporučljivo je napraviti alopurinolski test. On može otkriti žene heterozigote za navedenu mutaciju, kod kojih klinički simptomi nisu izraženi. Bazira se na uzimanju lijeka alopurinola koji djelovanjem ksantin oksidaze prelazi u oksipurinol koji onda inhibira orotidin

monofosfat dekarboksilazu i uzrokuje pojačano izlučivanje orotske kiseline i orotidina, jer je inhibiran korak u kojem nastaje uridin monofosfat. U pacijenata sa smanjenom aktivnošću OTC enzima, zbog viška karbamoilfosfata, preferiran je put de novo sinteze pirimidina, te samim time kod takvih pacijenata primjenom alopurinola povećane su koncentracije orotske kiseline i orotidina. Do pojačanog izlučivanja dolazi kod heterozigotnih ženskih nosioca mutacija, kao i kod oboljelih muških i ženskih osoba.

S obzirom da je klinička slika vrlo različita, laboratorijski nalazi imaju značajnu ulogu u postavljanju konačne dijagnoze bolesti. U akutno ugroženog novorođenčeta, oni trebaju biti što prije gotovi, što uvelike povećava pozitivan ishod. Treba napomenuti da u vrijeme metaboličkih kriza, uzorak treba uzeti što prije, jer je upravo takav uzorak vrlo informativan, jer kada se stanje stabilizira može se desiti da se neki metaboliti snize što može otežati postavljanje dijagnoze (Barić, 2011).

Liječenje ovakvih pacijenata se zasniva na strogo izbjegavanju amonijaka u prehrani odnosno strogo kontrolirana niskoproteinska prehrana jer sam cilj jeste smanjiti unos dušika u organizam.

1.3.1.2. Ostali poremećaji urea ciklusa

Relativno rijedak poremećaj urea ciklusa jeste manjak karbamoilfosfat sintetaze 1. Do poremećaja dolazi bilo da je došlo do greške u transkripciji, translaciji, transportu enzima u mitohondrij ili njegovom nepravilnom precesuiranju iz prekursora u aktivni oblik proteina i samim tim dolazi do defekta enzima i nastanka same bolesti.

Manjak N-acetil glutamat sintetaze predstavlja jedan od težih oblika metaboličkih poremećaja urea ciklusa i pacijentima čija klinička slika pokazuje nemjerljive vrijednosti ovog enzima razvijaju teška klinička stanja već 72 sata nakon rođenja. Za ovaj poremećaj postoji lijek koji se uzima per os (karbamil glutamat) i on je analog N-acetil glutamatu koji se kao takav ne sintetizira zbog pomenute mutacije, dok sami N-acetil glutamat se vrlo brzo kao lijek razgrađuje i ne prelazi membrane i samim tim nije prvi izbor pri liječenju ovog poremećaja

Citrulinemija tipa 1 predstavlja manjak argininosukcinat sintetaze koja je

karakteristična sa izrazito visokim koncentracijama citrulina u plazmi. Mutirani gen za ovu bolest smješten je na kromosmu 9.

Postoji više oblika ove bolesti pa razlikujemo akutni oblik koji se javlja u novorođenačkoj dobi sa vrlo progresivnim tijekom, dok oblik koji se javlja u kasnijim godinama života je dosta blaži bez samih simptoma i hiperamonijemije. Postoji i treći oblik ovog oboljenja u koji se pojavljuje kod žena za vrijeme trudnoće i u kojem one imaju simptome koji mogu biti opasni, ako ih se odgovarajućom terapijom ne ukloni (Quinonez, 2004).

Citrulinemija tipa 2 koja je karakterizirana smanjenom aktivnošću aspartat-glutamat transportera koji se naziva citrin i smješten je na membrani mitohondrija. Zbog poremećaja prijenosa aspartata, smanjena je njegova sinteza u citosolu, a samim tim smanjena je sinteza argininosukcinata iz citrulina. Također je smanjena razina glutmata u mitohondriju i sinteza N-acetilglutamata, što doprinosi smanjenom odvijanju ciklusa ureje. Većina pacijenata s ovim poremećajem su Japanci i Azijci, koji imaju prisutnu mutaciju u genu za citrin te se ovaj oblik bolesti često javlja i u odrasloj dobi (Nyhan i sur., 2005).

Argininosukcinična acidurija je autosomno-recesivna bolest koja je karakterizirana deficijencijom argininosukcinične liaze, enzima koji je osim u jetri eksprimiran i u ostalim tkivima i samim tim njegova aktivnost može biti ispitivana u eritrocitima i kulturi fibroblasta. Od specifičnih simptoma za ovo stanje karakteristična je pojava Trichorrhexis nodosa koji se opisuje kao poremećaj karakteriziran krhkom, lomljivom kosom i alopecijom kao konačnom posljedicom.

Argininemija je posljedica smanjene aktivnosti enzima arginaze. Pored jetrene arginaze pronađena je i bubrežna arginaza, pri čemu je sličnost u njihovoj strukturi i funkciji oko 58%, koja je odgovorna za relativno normalnu sintezu ureje kod bolesnika sa argininemijom, međutim bubrežna arginaza ne može nadoknaditi deficit jetrene arginaze koja je podrijetlom iz crvenih krvnih stanica.

Kod većine pacijenata simptomi progrediraju od prve do treće godine života i čak pri rođenju oni mogu u potpunosti izostati da bi se kasnije manifestirali u obliku hiperamonijemije koja je svakako blaža za razliku od ostalih poremećaja urea ciklusa.

HHH sindrom (hiperornitinemija, hiperamonijemija, homocitrulinurija) je

poremećaj u genu za transporter ornitin pri čemu se on kao takav ne može transportirati iz citosola u mitochondrij što za posljedicu ima u potpunosti nefunkcionalan urea ciklus tj. hiperamonijemiju. Zbog nakupljanja ornitina javlja se hiperornitinemija, a homocitrulinurija je posljedica nastanka homocitrulina spajanjem karbamoilfosfata sa aminokiselinom lizinom.

Lizinurična intolerancija proteina je karakterizirana abnormalnim prijenosom bazičnih aminokiselina (lizin, ornitin, arginin) iz same unutrašnjosti stanice kroz bazolateralnu membranu prema izvanstaničnom prostoru. Ovaj poremećaj uveliko utječe na urea ciklus, ali izravno s njim nije povezan, jer dovodi do smanjenih koncentracija lizina, ornitina, arginina u krvi.

1.3.2. Dijagnostika poremećaja urea ciklusa

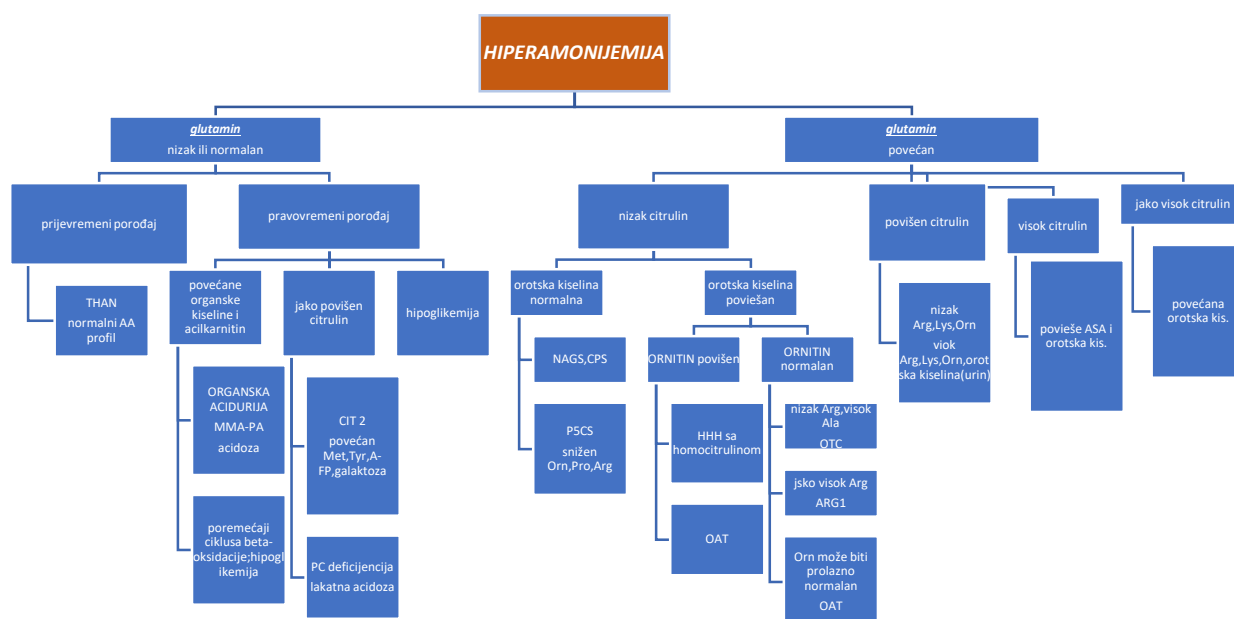
Klinička slika kod poremećaja ciklusa ureje varira od povraćanja, slabog apetita pa sve do letargije i kome ovisno o stupnju hiperamonijemije i stupnju uznapredovalosti same bolesti. Karakteristični su neorološki simptomi, psihijatrijski simptomi, nastanak cerebralnog edema, hiperventilacije sa posljedicom razvitka respiratorne alkalozе kod novorođenčadi, kod kojih se javlja i stanje nalik sepsi. Znakovi koji se javljaju u novorođenačkoj dobi su najčešće mnogo teški poput letargije, slabog apetita, povraćanja i konvulzija, dok bolesti koje se javljaju kasnije utječu na rast i razvoj, ali povraćanje konvulzije i slabost mogu također biti prisutni.

Kod pacijenata s bilo kojim oblikom poremećaja ciklusa ureje često dolazi do „metaboličkih kriza“ zbog nagle povećane koncentracije amonijaka. Takve krize su često potaknute nekim drugim čimbenicima, izuzev same bolesti, kao što su infekcije, lijekovi, naglim unosom proteina prehranom, vrućica i drugi. Za vrijeme takve akutne bolesti potrebno je hitno zbrinjavanje i liječenje bolesnika restriktivnom proteinskom prehranom.

Tablica 12. Laboratorijske pretrage kod poremećaja urea ciklusa

OSNOVNE LABORATORIJSKE PRETRAGE	CRP, kompletna krvna slika, elektroliti, aminotransferaze, kreatin kinaza, urea, kreatinin, testovi zgrušavanja krvi i urati
METABOLIČKE PRETRAGE	acidobazni status, glukoza u krvi, laktat, amonijak i ketonska tijela
SPECIJALNE METABOLIČKE PRETRAGE	Ukoliko neki od metaboličkih parametara značajno odstupa od normalne vrijednosti rade se specijalne metaboličke pretrage u cilju uspostavljanja odgovarajuće dijagnoze i same terapije.

U samu skupinu specijalnih metaboličkih pretraga spadaju orijentacijski testovi s urinom, određivanje aminokiselina u plazmi, po potrebi i likvoru kod hipotoničnog novorođenčeta poremećene svijesti u kojeg treba sumnjati i na neketotičnu hiperglicinemiju i naravno određivanje organskih kiselina u urinu (kod sumnje na postojanje organskih acidurija) i karnitina u serumu (ukupni i slobodni, profil acil-karnitina u plazmi).



Slika 4. Dijagnostički algoritam kod neonatalne hiperamonijemije (Häberle i sur, 2012)

A-FP, α fetoprotein; CIT 2, citrulinemija tipa 2; CPSD, manjak CPS1 enzima; HI-HA, sindrom hiperinzulinizam/hiperamonijemija; HMG, manjak 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA liaze; LPI, lizinurična intolerancija proteina; OATD, manjak ornitin aminotransferze; MMA, metilmalonska acidemija; PA, propionska acidemija; PC, piruvat karboksilaza; P5CSD, manjak pirolin-5-karboksilat sintaze; THAN, prolazna hiperamonijemija novorođenčadi; TPD, manjak trifunkcionalnog proteina; U, urin.

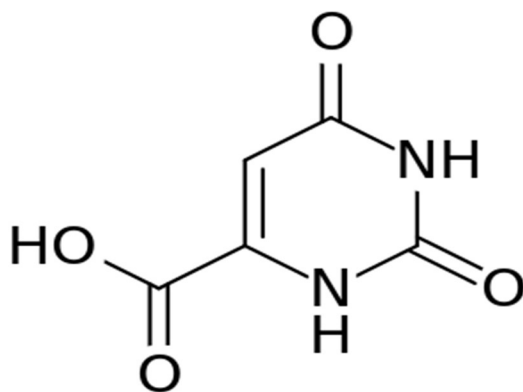
Mjeri se razina aminokiselina koje se određuju u plazmi ili serumu, dok je za ovaj rad važnij naglasiti da se u urinu mjeri koncentracija orotske kiseline kako bi se razlikovao manjak CPS1 enzima, kod kojeg je orotska kiselina normalna ili snižena, od OTC manjka kod kojeg je ona značajno povišena, zbog povećanih koncentracija karbamoilfosfata koji se spaja s aspartatom te nizom reakcija nastaje orotska kiselina. Kod OTC manjka orotska kiselina se izlučuje u koncentracijama većim od 1000 μmol/mol kreatinina, dok je normalna vrijednost 1-10 μmol/mol kreatinina (Mönch, 2014).

Orotska kiselina je povišena i u argininemiji, citrulinemiji i ostalim poremećajima, ali znatno manje.

Novorođenački probir kao takav od manje je važnosti za ove vrste metaboličkih poremećaja iz razloga što klinički simptomi nastupaju vrlo rano čak i prije samih rezultata pretaga i karakterizirani su vrlo lošom kliničkom prognozom, ali ipak određene zemlje kao što su SAD, Australija provode novorođenački probir na određene poremećaje iz ove kategorije, ali odjetljivost i specifičnost takvih mjerenja još uvijek do kraja nije poznata. (Häberle i sur., 2012).

1.4. OROTSKA KISELINA

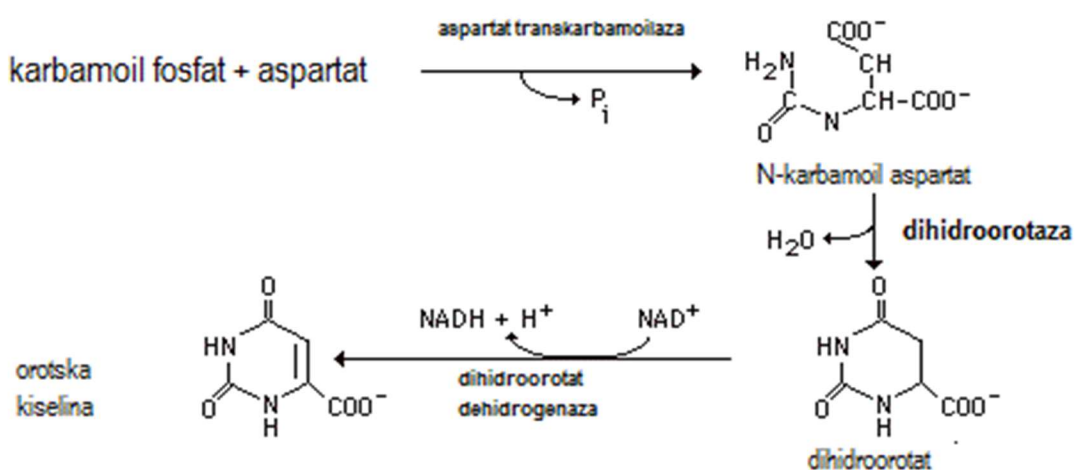
Orotska kiselina je heterociklički spoj koja je poznata i kao pirimidinkarboksilna kiselina. Povijesno se smatralo da je orotska kiselina vitamin i to vitamin B13 (kao dio vitamina B kompleksa), ali se zapravo ona promatra kao kiselina koja u ljudskom organizmu nastaje kao posljedica nefunkcionalnosti u ciklusu ureje kao aletrnativni metabolit.



- Molekularna formula:**C₅H₄N₂O₄**
- Molekularna masa:**156,097 g/mol**
- Naziv po nomenklaturi IUPAC:
2,4diokso-1-pirimidin-6-karboksilnda kiselina
- Prisutnost:jetra i pankreas kod čovjeka

Poznato nam je da orotska kiselina nastaje djelovanjem mitohondrijskog enzima dihidroorotat dehidrogenaze ili nastaje u putu sinteze pirimidina, a često se koristi i kao mineralni nosač za određene dodatke prehrani kako bi se povećala njihova biodostupnost (litijev orotat).

Dihidroorotat se prevodi u orotsku kiselinu djelovanjem enzima dihidroorotat dehidrogenaze, koja se kasnije kombinira sa fosforibosil pirofosfatom (PRPP) kako bi nastao orotidin-5'-monofosfat (OMP) i iz toga proizlazi vrlo značajna karakteristika da je pirimidinski prsten u potpunosti sintetiziran prije vezanja na ribozni šećer, dok kod purina to nije slučaj.



Slika 5. Sinteza orotske kiseline (preuzeto i prilagođeno sa www.gout-aware.com/formation-of-orotic-acid).

Važna činjenica za orotsku kiselinu da se ona prevodi u UMP pomoću UMP sintaze, multifunkcionalnog proteina sa dvije orotatne fosfokarboksiltransferaze i sa orotidilat dekarboksilaznom aktivnošću. Najčešća pogreška u sintezi pirimidinskog nukleotida jeste upravo mutacija unutar multifunkcionalne protinske UMP sintaze što ima za posljedicu zaustavljanje pretvorbe orotske kiseline u UMP, a posljedično tome i u druge pirimidine. Posljedica svega jeste drastično visoke koncentracije orotske kiseline u plazmi, ali i prisutnost orotske kiseline u urinu u značajno visokim vrijednostima što se u mokraći često može primjetiti po prisutnosti orotskih kiselih kristala.

Orotska kiselina je povišena u urinu kada dolazi do određenih poremećaja urea ciklusa tj. kada su aktivirani alternativni putovi metabolizma viška amonijaka, a to je načešće slučaj kod deficita ornitin transkarbamilaze (OTC deficit) ili kod citrulinemije. Određivanje orotske kiseline je važno za utvrđivanje uzroka hiperamonijemije i vrlo često je pokazatelj pojedinog metaboličkog poremećaja koji naravno dovode do ozbiljnih kliničkih posljedica, a ukoliko se pravovremeno ne liječe i do smrti. Pojedinci sa ozbiljnom jetrenom disfunkcijom zbog određenih virusnih infekcija, alkoholičari ili konzumenti opojnih sredstava kao i pacijenti koji imaju ozbiljnije gastrointestinalna krvarenja mogu imati povećanu razinu orotske kiseline.

Orotska kiselina ima izravan uticaj na sintezu samih folata, koji zajedno sa orotskom kiselinom su učestvuju u sintezi DNA. Orotska kiselina u našem organizmu nastaje kao intermedijer u sintezi pirimidinskih nukleotidnih baza tirozina, citidina i uracila. Zajedno pirimidinski nukleotidi čine polovicu komponenata potrebnih za sintezu DNA/RNA dok drugu polovicu čine purinske baze adenin i guanin, čija sinteza je u potpunosti neovisna o orotskoj kiselini.

Enzim orotat fosforibosiltransferaza je enzim koji je ključan za katalizu prvog koraka pretvorbe orotske kiseline u uridin, što olakšava vezanje same riboze i kao konačan produkt nastaje orotidin-5'-monofosfat (OMP) koji je prekursor u sintezi uridin-5'-monofosfata (UMP-a).

1.4.1. Orotska acidurija

Orotska acidurija je poremećaj koji se nasljeđuje autosomno-recesivno i najčešće je uzrokovano defektom u genu za enzim UMP sintazu, jednog multifunkcionalnog enzima čija funkcija i defekt je opisan u poglavlju **1.4. Orotska kiselina**.

Kao poremećaj definirana je nakupljanjem orotske kisline u organizmu usljed poremećaja urea ciklusa pri čemu se amonijak koji se uklanja urea ciklusom i prevodi u ureu ne metabolizira normalno pri čemu se aktiviraju alternativni putovi samog metabolizma i kao produkt tog alternativnog puta nastaje orotska kiselina. Također nam je poznato da je orotska kiselina ključna komponenta u sintezi primidina i ukoliko je ona deficitarna tj. ukoliko je sinteza pirimidina smanjena koji je ključan u konverziji dihidrofolata i tetrahidrofolata.

Orotska acidurija je kao poremećaj karakteristična kod OTC deficita koji je detaljno objašnjen u poglavlju 1.3.1.1.

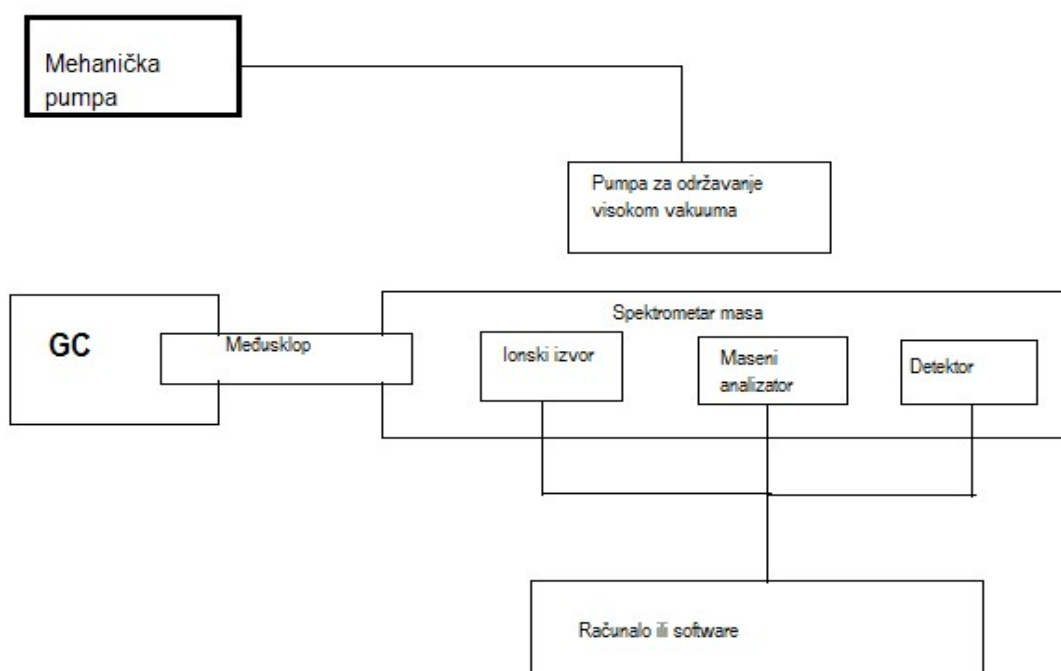
Tablica 13. Informacijska kartica orotske acidurije

BOLEST	Naziv: Orotska acidurija Ključni protein(enzim): uridin-5'-monofosfat sintetaza Genski lokus: 3q21.2 Zaključak: <ul style="list-style-type: none"> • vrlo vrijedak autosomno-recesivni poremećaj • Orotska acidurija tip 1 (deficit UMPS) • Orotska acidurija tip 2 (deficit oritidin-5'-monofosfat dekarboksilaze)
SIMPTOMI	Anemija, kongenitalna srčana bolest, dijareja, mentalna retardacija, hematurija, hipotonija, infekcije, zaostali rast, neutropenija, prisutnost organskih kiselina u urinu, urolitijaza.
LABORATORIJSKE PRETAGE	<ul style="list-style-type: none"> • Organske kiseline mmol/mol kreatinina (U) • Hemoglobin g/dl (K) • Organske kiseline μmol/L (P)
NORMALNE VRIJEDNOSTI LABORATORIJSKIH PRETRAGA	<ul style="list-style-type: none"> • Orotska kiselina 0-6,00 mmol/mol kreatinina (U) (neonatus) • Hemoglobin 12-20 g/dl (K) (novorođenče) • Hemoglobin 12-15 g/dl (K) (dijete) • Orotska kiselina 0-11,00 mmol/mol kreatinina (U) (dijete) • Orotska kiselina 0-2,35 mmol/mol kreatinina (U) (novorođenče) • Orotska kiselina 0-0,50 μmol/L (P) (dijete) • Orotska kiselina 0,00 (L) (dijete)

U-urin;K-krv;P-plazma,L-likvor

1.5. PLINSKA KROMATOGRAFIJA-SPEKTROMETRIJA MASA

Plinska kromatografija-spektrometrija masa je analitička tehnika koja kombinira moć razdvajanja plinske kromatografije i izvanrednu specifičnost i osjetljivost spektrometra masa. U spektrometru masa fragmentacijom molekula nastaju ioni koje spektrometar analizira prema molekularnoj masi, odnosno prema osmjeru mase i naboja (m/z). Nefragmentirani ioni analizirane molekule nazivaju se molekularni ioni, a najzastupljeniji ion u spektru osnovnim pikom.



Slika 7. Shema GC-MS-a

Dijelovi GC-MS-a (Slika 7.):

- Injektor
- Plinski kromatograf
- Spektrometar masa (međusklop, ionski izvor, analizator masa i detektor)
- Vakuum sustav
- Računalo

1.5.1. Plinski kromatograf

Pod plinskom kromatografijom se podrazumijeva plinsko-tekućinska kromatografija čiji temelj funkcioniranja jeste razdvajanje tvari između pokretne plinovite i nepokretne tekuće faze. Ona se provodi tako da se analizirani spojevi prevedeni u plinoviti oblik eluiraju pomoću plina kao pokretne faze uzduž kolone. Pokretna faza je sam plin nosač i kao takav ne dolazi u interakcije sa analitom.

Kod plinske kromatografije odjeljivanje se temelji na adsorpcijsko-desorpcijskom procesu između plinovite i čvrste faze pri čemu tipične nepokretne faze čine anorganski adsorbensi kao npr. Al-silikat, silika gel, porozni polimeri, aktivni ugljen ili teflon. Prednosti ovakve kromatografije je u širokom radnom temperaturnom intervalu, stabilnosti bazne linije i vrlo brzo uravnoteženje dok sa druge strane nedostaci su prisutni u vidu asimetričnih pikova, koji nastaju zbog uskog linearnog područja adsorpcijske izoterme, duga vremena zadržavanja zbog velikih adsorpcijskih entalpija kao i katalitičke aktivnosti mnogih adsorbenasa i ograničen broj adsorpcijskih medija koje je teško standardizirati.

Plinski kromatografski sustavi razlikuju se po tipu plina samog nosača, sustavu injektiranja, kolonama i detektorima. Kao plinovit nosač mogu poslužiti He, Ar, N₂, CO₂, H₂.

Protok plina kao mobilne faze mora biti konstantan zbog reproducibilnosti samih mjerenja. Spojevi koji se kromatografiraju, otopina ili plin, injektiraju se preko injektora u struju plina nosača. Temperaturu je potrebno kontrolirati pri čemu je temperatura samog sustava 50°C iznad vrelišta najteže isparljive sastavnice smjese.

Kolone mogu biti punjene ili kapilarne pri čemu je kod punjenih kolona nepokretna faza imobilizirana na granuliranoj površini dok kod kapilarnih kolona unutarnja stijenka kapilare je prevučena izravno ili preko tankog sloja poroznog čvrstog nosača tankim filmom tekuće nepokretne faze.

1.5.1.1. Kapilarne kolone

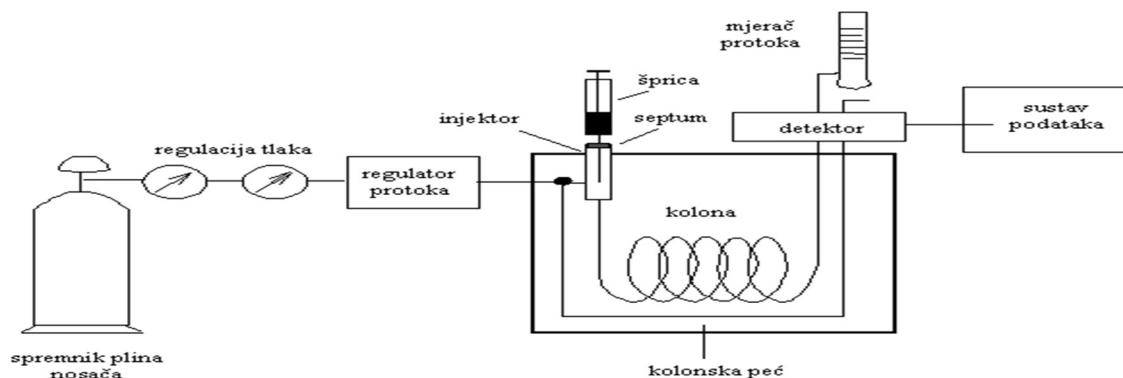
Pri odabiru kapilarnih kolona potrebno je voditi računa o određenim parametrima:

- Vrsta stacionarne faze; odgovarajuća polarnost govori o vrsti interakcija sa stacionarnom fazom tj. **nepolarne faze** razdvajaju spojeve primarno na temelju temperatura vrelišta. **Srednje polarne faze** zadržavaju spojeve prema

temperaturama vrelišta i induciranoj dipolarnoj interakciji ili vodikovim vezama dok **polarne i izrazito polarne faze** zadržavaju polarne spojeve uslijed dipol-dipol međudjelovanja funkcionalnih spojeva i same stacionarne faze. Kako raste polarnost, smanjuje se temperaturna stabilnost.

- Duljina kolone: najčešće se koriste kolone duljine 30 m. Za brze pretrage probiranja, jednostavnije smjese ili spojeve sa vrlo velik molekularnim masama koriste se kolone duljine 15 m, a za vrlo složene uzorke duljine 50,60 pa i 105 m.
- Debljina filma stacionarne faze (0,5-1-5 μ m): s povećanje same debljine filma, u pravilu se povećava i rezolucija između dva spoja koja eluiraju u neposrednoj blizini. Za spojeve sa niskom temperaturom vrelišta koriste se deblji filmovi kako bi im se omogućila dulja interakcija sa stacionarnom fazom i uzročno-posljedično tome povećala rezolucija. Za većinu spojeva koji se eluiraju na temperaturi do 300°C koriste se standardni filmovi (0,25 ili 0,5 μ m), a tanki (0,1 μ m) su idealni za spojeve visokih molekularnih masa.
- Unutrašnji promjer(ID): povećanjem ID povećava se kapacitet kolone, ali se ujedno i smanjuje rezolucija pa se za složenije uzorke preporučuju kolone užih ID. Kolone širog promjera pogodne su za uzorke širokog koncentracijskog raspona.

Detektori mogu omogućiti selektivno ili osjetljivo dokazivanje i najčešće su to plameno-ionizacijski detektor (FID), detektor termičke vodljivosti (TCD) i detektor zahvata elektrona (ECD). U obzir dolazi termionski detektor, spektroskopijski detektori dok za pouzdanu identifikaciju odjeljenih spojeva se danas najčešće koristi spektrometar masa (MS) kao detektor odnosno GC-MS sustav.



Slika 8. Shema plinskog kromatograma (preuzeto i prilagođeno iz Luterotti, 2011).

1.5.2. Spektrometar masa

Analiza spektrometrijom masa se sastoji od 3 ključna koraka:

1. IONIZACIJA (stvaranje molekularnih iona)
2. Razdvajanje molekularnih iona na temelju omjera mase i naboja (m/z)
3. Mjerenje količine molekularnih iona za svaki omjer mase i naboja

1.5.2.1. Međusklop

Međusklop predstavlja vezu između plinskog kromatografa i spektrometra masa odnosno omogućuje ulazak razdvojenih sastavnica uzorka u plinovitoj fazi pri atmosferskom tlaku u spektrometar masa gdje je tlak $<1 \times 10^{-4}$ Torra. Sa spektrometrom masa mogu se koristiti kolone različitog promjera, ali protok plina ne smije biti veći od 2ml/min kako se ne bi nadmašio kapacitet pumpe i zbog toga postoje ograničenja s obzirom na duljinu i promjer kolone:

- Narrow-bore kolone (ID 0,20 mm; OD 0,30mm) i mogu se instalirati izravno u međusklop
- Wide-bore kolone (ID 0,32mm; OD 0,44mm) duge 50 ili više metara koje se mogu izravno instalirati u međusklop uz uporabu razdjeljivača plina koji dolazi s kolone
- Megabore kolone (ID 0,53mm; OD 0,70mm) mogu se koristiti samo uz ugradnju razdvajaača. Kapilarne kolone unutrašnjeg promjera 0,250mm i manje uz protok plina do 2ml/min, mogu izravno ulaziti u analizator, dok je za kolone većeg promjera potrebno dijeljenje pri čemu manji udio plina nosioca ulazi u analizator.

1.5.2.2. Ionski izvor

U ionskom izvoru dolazi do razbijanja molekula i stvaranja iona u vakuumu ili kod atmosferskog tlaka. Metode kojima se provodi ionizacija su:

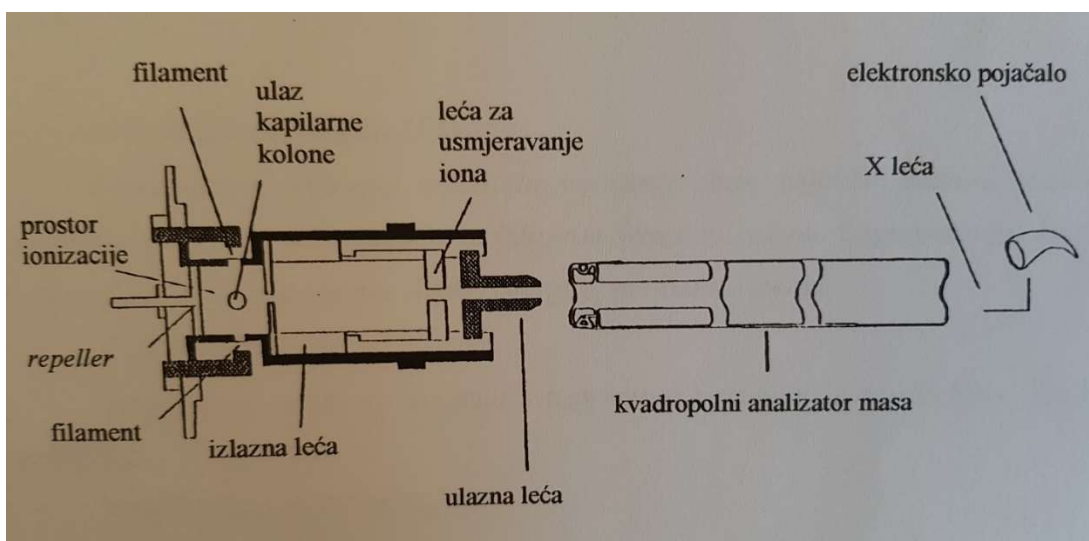
- Ionizacija molekula uz njihovo istovremeno prevođenje iz krutog ili tekućeg stanja u plinovito stanje-**DESORPCIJA**
- Elektronski udar (impakt)-**EI**
- Kemijska ionizacija-**CI**
- Bombardiranje brzim atomima-**FAB** (*fast atom bombardment*)

- Matriksom potpomognuta laserska ionizacija i desorpcija-**MALDI** (*Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization*)
- Desorpcija plazmonima-**PDI**
- Elektronsprej ionizacija-**ESI**
- Ionsprej ionizacija-**ISI**

Ove se tehnike koriste uglavnom za učinkovitu ionizaciju polimera visoke molekularne mase ili proteina tj. nehlapljivih, termolabilnih spojeva. U svim desorpcijskim ionizacijskim tehnikama primjenjuje se niska energija ($\ll 1\text{eV}$) pa se zbog toga ubrajaju u meke ionizacijske tehnike gdje dolazi do minimalne fragmentacije iona, a uzorak se unosi neposredno u izvor-direktna masena spektrometrija.

Najčešće ionizacijske tehnike u plinskoj kromatografiji-spektrometriji masa (GC-MS) su elektronska ionizacija (EI) ili kemijska ionizacija (CI)

a) Elektronska ionizacija (EI)



Slika 9. Shema ionskog izvora u elektronskoj ionizaciji i kvadropolnog analizatora masa (preuzeto i prilagođeno Maradin, 2001).

Analizirana molekula nakon eluiranja sa kolone u plinovitom obliku ulazi u ionski izvor gdje se sudara sa strujom elektrona (energije 70eV) koje proizvodi filament termoelektronskom emisijom i pri tom nastaju molekularni ioni gotovo iste molekularne kao i nativne mase.

Smatra se da je 20eV dovoljno za nastanak molekularnog iona, a zatim slijedi daljnja fragmentacija dok se sama energija ne potroši. Pri elektronskoj ionizaciji rijetko je prisutan molekularni ion ili je on malog intenziteta, a dobiveni spekter masa odgovara finger printu same molekule.

Do same fragmentacije dolazi u vakuumu pri čemu nastali pozitivni ioni se odbijaju ili električnim poljem bivaju povučeni iz izvora, ovisno o samoj konstrukciji ionskog izvora i sustavom leća elektronski se usmjeravaju i ubrzavaju u analizator masa dok sa druge strane neutralni ili negativni fragmenti se uklanjaju vakuum sustavom.

b) **Kemijska ionizacija (CI)**

U kemijskoj ionizaciji molekule plina (najčešće je to metan, amonijak ili izobutan) prilikom sudara sa molekulom dovode do fragmentacije iste. Najprije se ionizira sam plin elektronima visoke energije pri čemu tako nastali ioni se zatim sudaraju sa novom molekulom plina pri čemu takva novonastala molekula ionizira ciljnu molekulu koju želimo fragmentirati.

Molekularni ioni koji nastaju su protonirani i nisu toliko jako pobuđeni pa je manja fragmentacija nego što je to slučaj kod elektronske ionizacije i zbog toga je kemijska ionizacija pogodnija za određivanje molekularne mase i ubraja se u meke ionizacijske tehnike, ali nije tako korisna u proučavanju kemijskih struktura molekula.

1.5.2.3. *Analizator masa*

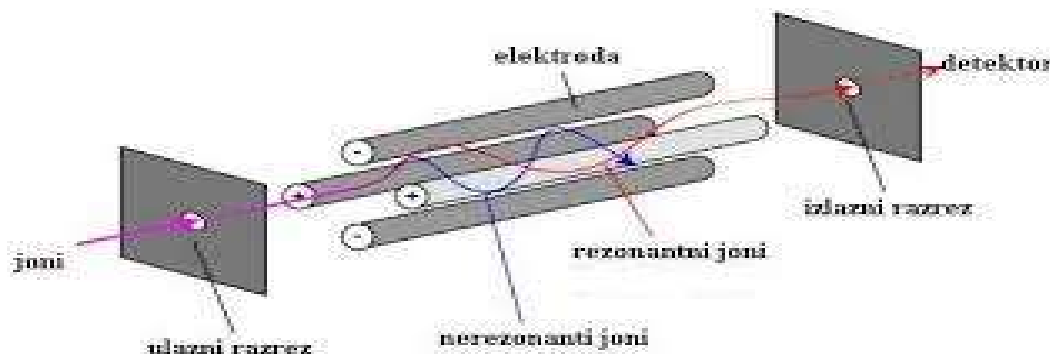
Analizatori masa imaju zadatak razdvajanja iona na temelju omjera mase i naboja, a razlikujemo njih par:

- Razdvajanje molekula prema brzini kretanja-**TOF** (*time of flight*)
- **Kvadrupol filter masa**
- **Magnetski filter masa**
- **Ionska klopka** (*ion trap*)
- **Orbitalna klopka** (*orbi trap*)

U svim analizatorima ioni putuju do detektora na temelju interakcije sa magnetnim ili električnim poljem dok je visoki vakuum potreban kako bi se spriječilo sudaranje iona sa drugim ionima ili molekulama kisika, dušika, vode ili ugljičnog dioksida što bi znatno

utjecalo na putanju fragmentiranih iona. Temperatura je obično povišena kako bi se spriječila adsorpcija ispitivanih iona na unutrašnju površinu.

a) Kuadropolni analizator



Slika 10. Shema kvadrupolnog analizatora(preuzeto i prilagođeno prema Pitt, 2009).

Kvadrupolni analizator se sastoji od 4 paralelne elektrode hiperboličnog presjeka i kombinacija promjenjivog statičnog i izmjeničnog električnog potencijala primijenjenih na parove suprotnih elektroda određuje promjenjivo električno polje i omogućuje odbijanje ili prolaz samo jednog iona određenog omjera m/z duž osi kvadrupola do detektora. Svi ostali prisutni ion zalijepit će se na elektorde ili će ih odstraniti vakuum sustav. Izmjenom jačine i frekvencije električnog polja ioni različitog omjera m/z bit će sekvencijski propušteni do detektora čime se dobiva spektar.

b) Analizator sa magnetskim poljem

Ioni koji su nastali u ionskom izvoru, ulaze u magnetsko polje koje ih zakreće, a radijus zakretanja ovisi o m/z omjeru, jakosti magnetskog polja (B) i naponu koji ubrzava ione kroz magnetsko polje (V). Kako ioni različite mase imaju različit radijus zakretanja, u određenom trenutku samo će jedan ion određenog omjera m/z pasti na detektor.

c) Time of flight analizator

U time of flight masenom analizatoru električnim poljem se ekstrahiraju i ubrzavaju ioni koji su nastali u ionskom izvoru te su usmjereni u analizator koji je sastavljen od duge ravne cijevi. Postignuta brzina je obrnuto razmjerna masi iona, točnije vrijednosti kvadrata drugog korijena m/z . Kako je udaljenosti između ionskog

izvora i detektora stalna, vrijeme koje je potrebno da ioni doputuju do detektora je razmjerno njihovoj brzini i karakteristično za svaki ion.

1.5.2.4. Snimanje spektara i praćenje odabranih iona

Spektrometrija masa može na dva načina raditi analize: opetovano snimanje spektara-skeniranje (*scan mode*) i snimanje odabranih iona (*SIM mode*). Samo skeniranje je vrlo važno kod analize nepoznatih spojeva kako bi dobili podatke o molekularnoj masi i strukturi i znamo da ovisno o brzini protoka mobilne faze i definiranim parametrima spektrometea masa, u jednoj sekundi, može se snimiti nekoliko spektara supstance koja se eluira. To zapravo znači da svaki vršak u kromatogramu, ovisno o njegovoj širini definiran je sa nekoliko skena. Zbroj intenziteta svih iona u jednom skenu prikazani kao funkcija broja skena ili vremena daju **ukupni ionski kromatogram (TIC)**. Iz ukupnog ionskog kromatograma mogu se izvući pojedini ioni, specifični za ispitivanu supstancu pa nastaje **kromatogram odabranih iona (EIC)**.

Praćenje odabranih iona (*SIM mode*) koristi se kada je poznat spektar i vrijeme retencije analiziranog spoja pa je analizator masa usmjeren na ione koji su karakteristični za taj spoj i na taj način značajno raste osjetljivost, i do 1000x, jer se dobiva više signala svakog odabranog m/z iona po jedinici vremena, odnosno povećan je omjer signala prema šumu bazne linije.

1.5.3. Vakuum sustav

Za postizanje i održavanje konstantnog vakuuma potreban je sustav dviju pumpi, predpumpe ili primarne pumpe i pumpe koja održava visoki vakuum. Predpumpa je potreban da bi snizila atmosferski pritisak do razine na kojoj može djelovati pumpa koja održava visoki vakuum. Najčešće korištene su difuzijske pumpe, ali neki aparati imaju ugrađene turbomolekularne pumpe. Karakteristike pumpe određuju koji se promjer kolone može koristiti tj. protok plina koji može nesmetano ulaziti u analizator, a da se sam vakuum sustav ne promijeni.

2.CILJ RADA

Organske acidurije kao skupina nasljenih metaboličkih poremećaja relativno su česte i zahtjevaju brzu dijagnostiku kako bi se uvelo odgovarajuće liječenje te nakon toga kontrolu terapije.

Orotska kiseline i orotidin kod zdravih osoba u urinu su pristuni u zanemarivo malim količinama dok njihovo izlučivanje drastično raste kod određenih poremećaja, kao što su:

- Poremećaj metabolizma pirimidina-nasljedna orotska acidurija

Ovaj poremećaj je uvjetovan defektom u enzima uridin monofosfat sintaze, orotat fosforiboziltransferaze i orotidin monofosfat dekarboksilaze.

(poremećaj detaljno objašnjen u poglavlju **1.4.1. Orotska acidurija**)

- Nasljedne metaboličke pogreške u urea ciklusu

Nalaz orotske kiseline u urinu je diferencijalno dijagnostički značajan kod nedostatka enzima ornitin transkarbamilaze. (poremećaj detaljno objašnjen u poglavlju **1.3.1.1. Deficit ornitin transkarbamilaze**)

- Ostala stanja kod kojih dolazi do povećane koncentracije orotske kiseline u urinu: trudnoća, nedostatak purin nukleozid fosforilaze te kod primjene alopurinola i 6-azouridina.

Stoga je cilj ovog rada bio:

- Napraviti kratku validaciju kvantitativnog *in house* mjerenja orotske kiseline u urinu metodom plinske kromatografije-spektrometrija masa
- Prikazati povezanost odgovarajuće terapije, kod pacijenta sa metaboličkim poremećajem urea ciklusa s promjenom koncentracije orotske kiseline

3. MATERIJALI I METODE

3.1. NAČELO POSTUPKA

Organske kiseline se ekstrahiraju etilacetatom iz uzorka nakon stvaranja stabilnih oksima okso-kiselina i zakiseljavanja. Nakon procesa centrifugiranja organski sloj se odvoji i upari pod strujom N_2 . Dodatkom BSTFA+1%TCMS organske kiseline se prevode u trimetilsilil derivate. Nakon iniciranja alikvota, helij prenosi uzorak kroz kolonu pri čemu dolazi do selektivnog zadržavanja sastojaka na stacionarnoj fazi. Razdvojeni sastojci strujom plina napuštaju kolonu i ulaze u spektrometar masa. U ionskom izvoru spektrometra masa dolazi do ionizacije i fragmentacije u sudaru sa ubrzanim elektronima energije **70 eV**. Ovakav oblik ionizacije naziva se ***electron impact***. Nastali ioni se izbacuju u kvadropolni filter masa koji u danom trenutku omogućuje prolaz odabranih iona, karakteriziranih određenim omjerom mase i naboja, m/z , do pojačala na izlazu gdje proporcionalno broju udaraca iona nastaju signali.

3.1.1. Primarni uzorak

Kao primarni uzorak se koristi urin koji se može zamrznuti na $-20^{\circ}C$ što je prije moguće. Prije samog mjerenja potrebno je odrediti kreatinin u uzorku i u sam postupak uzeti volumen koji sadrži $1\mu mol$ kreatinina. U sam postupak minimalno se uzima 0,2 ml urina, ali ukoliko je koncentracija kreatinina $<0,5\text{ mmol/L}$ uzima se najviše 2ml urina. Kao uzorci se također mogu koristiti serum, plazma I likvor (1ml)

3.2. ODREĐIVANJE OROTSKE KISELINE PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM-SPEKTROMETRIJOM MASA

3.2.1. Reagensi

- 2-oksokaproična kiselina, Sigma 06625
- O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil)-hidroksilamin hidroklorid, (PFBO)Sigma P 4190
- BSTFA + 1% TMCS, Sigma T 6381
- amonij-klorid, Merck

- etilacetat za spektroskopiju, Uvasol, Merck
- magnezij-sulfat, Merck
- etanol, Merck
- metanol, Merck
- heksan, Merck
- klorovodična kiselina, Merck
- sulfatna kiselina, Merck
- natrij-bikarbonat, Merck

3.2.2. Otopine

- deuterirani standard orotske kiseline
- Natrij-hidrogenkarbonat, 20 mmol/L
(otopiti 1,68 g NaHCO_3 u 100 ml destilirane vode)
- Sulfatna kiselina 0,5 M H_2SO_4
(13,89 ml 96% H_2SO_4 otopiti u 1000 ml destilirane vode)
- Kloridna kiselina, 20 mmol/L
(1,67ml 37% HCl otopiti u 1000ml destilirane vode)
- PFBO 50 mg/ml ($M_r=249,57$):
(otopiti 50 mg u 1 ml vode, pri čemu se alikvotira 1ml i čuvati na -20°C i zbog kratkog roka trajanja koristiti svježju otopinu)
- Magnezij sulfat koji treba osušiti prije svake uporabe u petrijevki koja se drži u sterilizatoru na 100°C
- Smjesa za siliranje: pomiješa se BSTFA +1% TMC sa radnom otopinom smjese alkana (omjer 1+10)
(npr. jedna ampula BSTFA i 100 μl radne otopine alkana)
- SMJESA ALKANA koja se koristi za provođenje unutarnje kontrole kvalitete i podešavanje retencijskog indeksa organskih kiselina u datoj metodi koja je pripremljena prema sljedećoj tablici:

Alkan	Mr(g/mol)	mg/100 ml heksana (μ L)
C ₁₀	142,1	47,61(65,2)
C ₁₂	170,1	24,75(33,0)
C ₁₄	198,1	21,35(28,1)
C ₁₆	226,1	18,48(24,0)
C ₁₈	254,1	17,9(22,9)
C ₂₀	282,1	15,58(-)
C ₂₂	310,1	15,91(-)
C ₂₄	338,0	13,11(-)
C ₂₆	366,1	12,83(-)

Tablica 14. Smjesa alkana

3.2.3. Uređaji i pribor

- Plinski kromatograf-spektrometar masa GCMS-QP2010Plus Shimadzu
 - plinski kromatograf HP 6890
 - kuadropolni spektrometar masa MSD 5972
 - biblioteka spektara
- DB 5-MS kapilarna kolona (low bleed 5%-difenil-95%-dimetil-arilen-siloksan koopolimer) duljine 30 m, ID 0,250mm, debljina stacionarne faze 1 mikrometar
- DB 5 kapilarna kolona (5%-difenil-95%-dimetilsiloksan kopolimer) duljine 30 m, ID 0,250mm, debljina stacionatne faze 1 mikrometar
- uparivač sa dušikom
- 0,22 μ m membranski filetri
- epruvete s navojem i čepovima obloženim teflonom

3.2.4. Izolacija organskih kiselina iz urina i derivatizacija

Urine je nakon odmrzavanja potrebno vorteksirati. Ukoliko se radi kvalitativna analiza određuje se i kreatinin. Za kvantitativnu analizu standard se dopuni sa destiliranom vodom do volumena od 1ml. Magnezijev sulfat u petrijevoj zdjelici

potrebno je staviti 1h na 100 °C i nakon toga pripremiti tri niza obilježenih epruveta sa navojem. Prije početka treće faze ekstrakcije upaliti uparivač da se zagrije na 60°C (minimalno 1h prije) i provjeravati volumen plina dušika.

1. faza

- u epruvete koje su označene brojem 1 pipetirano je 50µL standarda orotske kiseline SAU-01.2. (dilucija 1:20 s destiliranom vodom), dok je u ostalim epruvetama priređena dilucija 1:50 (500µL standarda SAU-01.1. i 500µL 20mM NaHCO₃)
- dodati 50µL deuteriranog standarda orotske kiseline
- dodati 50µL otopine PFBO
- urin je potrebno zakiseliti (na pH=2) dodatkom 200µL 0,5M H₂SO₄ i zatvoriti epruvete čepom
- sadržaj epruveta dobro promiješati (vorteksirati) i ostaviti na sobnoj temperaturi 1h kako bi se stvorili **oksimi**.

2. faza

- dodati 500µL NH₄Cl i vorteksirati

Prva ekstrakcija

- ekstrakcija se započinje dodatkom 5mL etilacetata i nakon toga zatvoriti epruvete čepom
- svaku epruvetu vorteksirati 1min (obavezno pratiti vrijeme na štoperici) kako bi se u epruveti stvorio vrtlog i nakon toga epruvete tako zatvorene centrifugirati 10 min na 3000rpm.
- nakon toga jedan po jedan uzorak, jednokratnom pasterovom pipetom, tj.ekstrakt (gornji organski sloj) prenijeti u drugu epruvetu unutar koje se nalazi bezvodni MgSO₄ (što zapravo predstavljaju drugi niz epruveta)

Druqa ekstrakcija

- ponoviti postupak ekstrakcije sa 5mL etilacetata (u prvi niz epruveta), svaku ponovno vorteksirati 1min, centrifugirati 10min na 3000rpm i organski sloj jednokratnom pipetom prenijeti u drugi niz epruveta (epruvete sa MgSO₄)
- ovako spojene esktrakte sa MgSO₄ dobro vorteksirati i ostaviti na sobnoj temperaturi 1h pri čemu su epruvete zatvorene

- centrifugirati 10min na 3000rpm

3. faza

- dekantiranjem odvojiti ekstrakt u treći niz čistih epruveta
- prenijeti otvorene epruvete u uparivač te upariti ekstrakt do suha pod temperaturom od 60 °C pod strujom N₂ pri čemu tijekom uparivanja treba strogo kontrolirati i čim je uzorak uparen epruvete treba izvaditi iz uparivača.
- dodati 300μl etanola, vortkesirati (pri čemu se upareni ekstrakt pomiješa sa etanolom) i nakon toga svega par minuta do suha uparavati.
- dodati 50μl smjese za siliranje (BSTFA +1% TMC (1 ml), diluirani alkani (100μl) i derivatizirati kuhanjem 1h na 60° C pri čemu su epruvete zatvorene.
- pripremljeni se uzorak iz epruvete sa navojem prenosi u bočice za automatizirani uzorkivač tekućina GC-MS-a pri čemu se injektira 1μl.

3.2.5. Radvajanje na kapilarnoj koloni i detekcija

- injektor: temperatura iniciranja 280° C
splitless mode
purge time 2 min
flow 5,0 ml/min
gas saver 5 min
total flow 17,1 ml/min
- mobilna faza: He
- protok mobilne faze: 0,8 ml/min
- temperaturni program:
 - 80° C-5minuta
 - 3,8° C/min do 180° C
 - 5 min na 180° C
 - 3,9° C/min do 200° C
 - 4,0° C/min do 300° C
 - 25 min na 300° C
- temperatura međusklopa 290° C

- spektrometar masa: scan mode
raspon skeniranja 40-650 a .m. u.
zadržavanje otapala 12 min
EMV 1800V
Kalibracija: *maksimum sensitivity auto tune*

3.4. Kratka validacija vlastitih(*in house*)kvantitativnih analitičkih metoda

Kratka validacija vlastitih kvantitativnih analitičkih metoda obuhvaća ispitivanje sljedećih karakteristika:

a) **preciznost (slučajna pogreška)**

-preciznost u seriji (ponovljivost)

Analizira se najmanje 3 uzorka različitih koncentracija (niske, srednje i visoke koncentracije) u seriji od 10 ponovljenih mjerenje iste pretrage u istom uzorku

-preciznost iz dana u dan (međupreciznost)

Analizira se najmanje 3 uzorka u duplikatu, od kojih jedan od uzoraka mora imati koncentraciju blizu granica same kvatifikacije (mjerenje se izvodi tijekom 20 dana)

-za analite kojima je utvrđena intraindividualna varijacija (CV_{intra}) je $CV < 0,5 CV_{intra}$

-za analite kojima nije utvrđena intraindividualna ili interindividualna varijacija i za ksenobiotike vrijedi CV 10% za srednje i visoke koncentracije, CV 20% za koncentracije na granici osjetljivosti same metode

b) **točnost (sustavna pogreška, bias)**

Koriste se srednje vrijednosti kontrolnih uzoraka dobivene iz preciznosti iu dana u dan
-za analite kojima je utvrđena intraindividualna ili interindividualna varijacija:

$$bias < 0,25 \times (CV_{intra}^2 + CV_{inter}^2)^{1/2}$$

-za analite kojima nije utvrđena interindividualna ili intraindividualna varijacija i za ksenobiotike: za srednje vrijednosti mjerenja unutar 15% očekivane vrijednosti, a za donju granicu kvantifikacije oko 20% očekivanje vrijednosti.

c) **Usporedba s drugom metodom**

Ukoliko se u laboratoriju koristi druga metoda potrebno je usporediti novu metodu sa postojećom i analizirati najmanje 50 uzoraka bolesnika s vrijednostima ispitivane pretrage iz cijelog koncentracijskog područja.

d) **Analitička osjetljivost**

-granica detekcije

U kromatografiji granica detekcije je injektirana količina koja rezultira pikom koji je najmanje 2-3 puta viši od šuma bazne linije i zapravo granicu detekcije odredimo tako da se u srednjoj vrijednosti slijepe probe doda trostruka vrijednost standardne devijacije.

-granica kvantifikacije

Donju granicu kvantifikacije moguće je odrediti na više načina:

- *LOQ prema preciznosti i točnosti*

Uzorak najniže koncentracije analizirati u 10 ponovljenih mjerenja pri čemu po kriteriju prihvatljivosti CV mora zadovoljiti kriterije definirane za preciznost i točnost

- *LOQ prema omjeru signala i šuma*

Uzorak slijepe probe analizira se u 10 ponovljenih mjerenja, a granica kvantifikacije je injektirana količina koja rezultira pikom koji je najmanje deset puta viši od šuma bazne linije.

- *LOQ prema standardnoj devijaciji signala slijepog uzorka*

Uzorak slijepe probe analizira se u 10 ponovljenih mjerenja, a granicu kvantifikacije odrediti tako da se srednjoj vrijednosti slijepe probe doda deseterostruka vrijednost standardne devijacije prema rasponu kalibracijske krivulje.

e) **Analitička specifičnost**

Ukoliko su nam poznati literaturne interferencije iz uzorka (hemoliza, razgradni produkti) ili iz okoliša (hrana, lijekovi i sl.) potrebno je takve interferencije ispitati. Sama metoda mora razlikovati mjereni analit od drugih komponenti, koje kao takve mogu biti prisutne u uzorku, a to uključuje različite metabolite, nečistoće, razgradne produkte i komponente matriksa.

Ako se analit ne određuje analitičkom metodom koja uključuje potvrdni detektor (

maseni spektrar, UV spektrar) potrebno je analizirati najmanje 6 različitih slijepih uzoraka (uzorci koji ne sadrže mjerni analit)

f) Stabilnost uzorka

Kod vlastitih analitičkih metoda koje uključuju pripremu standarda i kalibratora u laboratoriju potrebno je ispitati stabilnost analita u uzorku:

-dugotrajna stabilnost (20dana)

Potrebno je ispitati stabilnost analita u uzorku u uvjetima same pohrane npr. u istim posudama, na istoj temperaturi i najmanje u rasponu koji se očekuje od svih uzoraka. Potrebno je analizirati najmanje 2 pripremljena standardna uzorka u duplikatu, od kojih jedan uzorak mora imati koncentraciju blizu granice kvantifikacije tijekom 20 dana.

-stabilnost pri smrzavanju/odmrzavanju

Ispitati stabilnost analita u 2 koncentracije u triplikatu tijekom najmanje 3 ciklusa smrzavanja/odmrzavanja

g) Linearnost (analitičke granice mjernog područja)

Ako je odnos između mjernog signala i koncentracije analita linearan, u definiranom rasponu potrebno je odrediti najmanje 5 koncentracija u 3-6 ponovljenih mjerenja. Ukoliko takav odnos nije linearan, za samo određivanje kalibracijske krivulje potrebne su dodatne točke.

Procjena linearnosti provodi se temeljem vizualne procjene i izračuna jednadžbe pravca, odsječka i nagiba pravca, te koeficijent korelacije mora biti veći ili jednak od 0,990.

h) Referentni interval

Ukoliko je referentni interval preuzet iz literature potrebno je verificirati vrijednosti na najmanje 20 ispitanika populacije za koju će se referentni interval kao takav primjenjivati. U suprotnom potrebno je izraditi vlastite referentne intervale ispitivanjem najmanje 120 ispitanika po određenoj kategoriji (dob, spol i sl.)

Alternativno, odgovorna osoba svojim potpisom može potvrditi da su referentni intervali proizvođača ili oni koji su literaturno navedeni prikladni za populaciju kojoj su namijenjeni.

4. REZULTATI

Koristeći prethodno opisan postupak određivanja orotske kiseline u urinu metodom plinske kromatografije-spektrometrija masa dobiveni su sljedeći rezultati koji su sustavno prikazani.

Tablica 15. Izmjerene vrijednosti za 02.02.2017.

DATUM	VRSTA/LOT KONTROLNOG UZORKA	RASPON	CILJNA VRIJEDNOST	IZMJERENA VRIJEDNOST
02.02.2017	SKML L2 URIN 2015.0092	14-23	18,8	19,2
02.02.2017	SKML L2 2017.0092	76-101	88,7	90,4

Tablica 16. Izmjerene vrijednosti za 14.03.2017. i 16.03.2017.

DATUM	VRSTA/LOT KONTROLNOG UZORKA	RASPON	CILJNA VRIJEDNOST	IZMJERENA VRIJEDNOST	DILUCIJA
14.03.2017.	SAU L2 2015.0092-001	14-23	0,9	0,6(0,6X20=12)	dil 1:20
14.03.2017	SAU L2 2015.0092-002	14-23	0,9	0,6(12)	dil 1:20
14.03.2017	SAU L2 2015.0092-003	14-23	0,9	0,6(12)	dil 1:20
14.03.2017	SAU L2 2015.0092-004	14-23	0,9	0,6(12)	dil 1:20
14.03.2017	SAU L2 2015.0092-005	14-23	0,9	0,6(12)	dil 1:20
14.03.2017	SAU L2 2015.0092-006	14-23	18,8	18,8	
14.03.2017	SAU L2 2015.0092-007	14-23	18,8	18,5	

14.03.2017	SAU L2 2015.0092-008	14-23	18,8	19,3	
14.03.2017	SAU L2 2015.0092-009	14-23	18,8	18,6	
14.03.2017	SAU L2 2015.0092-010	14-23	18,8	453,8	
14.03.2017	SAU L1 2015.0091-011	76-101	88,7	91,7	
14.03.2017	SAU L1 2015.0091-012	76-101	88,7	89,6	
14.03.2017	SAU L1 2015.0091-013	76-101	88,7	89,9	
14.03.2017	SAU L1 2015.0091-014	76-101	88,7	90,1	
14.03.2017	SAU L1 2015.0091-015	76-101	88,7	90,5	
16.03.2017	SAU L1 2015.0091	76-101	88,7	90,3	

Tablica 17. Tablica rezultata dobivenih 21.3.2017.

DATUM	VRSTA/LOT KONTROLNOG UZORKA	RASPPON	CILJNA VRIJEDNOST	IZMJERENA VRIJEDNOST
21.03.2017	SAU L1 2015.0091-003	14-23	18,8	17,6
21.03.2017	SAU L1 2015.0091-004	14-23	18,8	17,6
21.03.2017	SAU L2 2015.0092-005	76-101	88,7	51,6
21.03.2017	SAU L2 2015.0092-006	76-101	88,7	51,7

Tablica 18. Rezultati dobiveni 22.03.2017.

DATUM	VRSTA/LOT KONTROLNOG UZORKA	RASPON	CILJNA VRIJEDNOST	IZMJERENA VRIJEDNOST	DILUCIJA
22.03.2017.	SAU L2 2015.0092-001	14-23	18,8	0,8X20=16	dil 1:20
22.03.2017	SAU L2 2015.0092-002	14-23	18,8	0,8X20=16	dil 1:20
22.03.2017	SAU L1 2014.0091-003	14-23	18,8	23,8	
22.03.2017	SAU L1 2014.0091-004	14-23	18,8	23,8	
22.03.2017	SAU L1 2014.0092-005	76-101	88,7	91,2	
22.03.2017	SAU L1 2014.0092-006	76-101	88,7	91,2	

Tablica 19. Rezultati dobiveni 23.03.2017.

DATUM	VRSTA/LOT KONTROLNOG UZORKA	RASPON	CILJNA VRIJEDNOST	IZMJERENA VRIJEDNOST	DILUCIJA
23.03.2017.	SAU L2 2015.0092-001	14-23	18,8	0,9X20=18	dil 1:20
23.03.2017	SAU L2 2015.0092-002	14-23	18,8	0,9X20=18	dil 1:20
23.03.2017	SAU L1 2014.0091-003	14-23	18,8	23	
23.03.2017	SAU L1 2014.0091-004	14-23	18,8	23	
23.03.2017	SAU L2 2014.0092-005	76-101	88,7	91,4	
23.03.2017	SAU L2 2014.0092-006	76-101	88,7	91,4	

Tablica 20. Rezultati dobiveni 27.03.2017. i 29.03.2017

DATUM	VRSTA/LOT KONTROLNOG UZORKA	RASPON	CILJNA VRIJEDNOST	DOBIVENA VRIJEDNOST	DILUCIJA
27.03.2017.	SAU L2 2015.0092-001	14-23	18,8	0,6X20=12	dil 1:20
27.03.2017	SAU L2 2015.0092-002	14-23	18,8	0,6X20=12	dil 1:20
27.03.2017	SAU L2 2015.0092-003	14-23	18,8	0,6X20=12	dil 1:20
27.03.2017	SAU L1 2014.0091-004	14-23	18,8	18,6	
27.03.2017	SAU L1 2014.0091-005	14-23	18,8	18,6	
27.03.2017	SAU L1 2014.0091-006	14-23	18,8	18,6	
27.03.2017	SAU L2 2014.0092-007	76-101	88,7	92,4	
27.03.2017	SAU L2 2014.0092-008	76-101	88,8	92,4	
27.03.2017	SAU L2 2014.0092-009	76-101	88,7	92,4	
27.03.2017	SAU L1 2014.0091-010	14-23	18,8	17,6	
27.03.2017	SAU L1 2014.0091-011	14-23	18,8	17,6	
27.03.2017	SAU L1 2014.0091-012	14-23	18,8	17,6	
29.03.2017	SAU L2 2015.0092	14-23	18,8	16	

Tablica 21. Rezultati dobiveni 03.04.2017.

DATUM	VRSTA/LOT KONTROLNOG UZORKA	RASPON	CILJNA VRIJEDNOST	DOBIVENA VRIJEDNOST	DILUCIJA
03.04.2017.	SAU L2 2015.0092-001	14-23	18,8	0,6X20=12	dil 1:20
03.04.2017	SAU L2 2015.0092-002	14-23	18,8	0,6X20=12	dil 1:20
03.04.2017	SAU L1 2014.0091-003	14-23	18,8	17,2	
03.04.2017	SAU L1 2014.0091-004	14-23	18,8	17,2	
03.04.2017	SAU L2 2014.0092-005	76-101	88,7	73	
03.04.2017	SAU L2 2014.0092-006	76-101	88,7	73	

Tablica 22. Rezultati dobiveni 04.04.2017.

DATUM	VRSTA/LOT KONTROLNOG UZORKA	RASPON	CILJNA VRIJEDNOST	DOBIVENA VRIJEDNOST	DILUCIJA
04.04.2017.	SAU L2 2015.0092-001	14-23	18,8	0,6X20=12	dil 1:20
04.04.2017	SAU L2 2015.0092-002	14-23	18,8	0,6X20=12	dil 1:20
04.04.2017	SAU L1 2014.0091-003	14-23	18,8	17	
04.04.2017	SAU L1 2014.0091-004	14-23	18,8	17	
04.04.2017	SAU L2 2014.0092-005	76-101	88,7	73	
04.04.2017	SAU L2 2014.0092-006	76-101	88,7	73	

Tablica 23. Rezultati dobiveni 05.04.2017.

DATUM	VRSTA/LOT KONTROLNOG UZORKA	RASPON	CILJNA VRIJEDNOST	DOBIVENA VRIJEDNOST	DILUCIJA
05.04.2017	SAU L2 2015.0092-001	14-23	18,8	0,7X20=14	dil 1:20
05.04.2017	SAU L2 2015.0092-002	14-23	18,8	0,7X20=14	dil 1:20
05.04.2017	SAU L1 2014.0091-003	14-23	18,8	18	
05.04.2017	SAU L1 2014.0091-004	14-23	18,8	18	
05.04.2017	SAU L2 2014.0092-005	76-101	88,7	73,4	
05.04.2017	SAU L 2 2014.0092-006	76-101	88,7	73,4	

Tablica 24. Rezultati dobiveni 06.04.2017.

DATUM	VRSTA/LOT KONTROLNOG UZORKA	RASPON	CILJNA VRIJEDNOST	DOBIVENA VRIJEDNOST	DILUCIJA
06.04.2017	SAU L2 2015.0092-001	14-23	18,8	0,8X20=16	dil 1:20
06.04.2017	SAU L2 2015.0092-002	14-23	18,8	0,8X20=16	dil 1:20
06.04.2017	SAU L1 2014.0091-003	14-23	18,8	18	
06.04.2017	SAU L1 2014.0091-004	14-23	18,8	18	
06.04.2017	SAU L2 2014.0092-005	76-101	88,7	73,2	
06.04.2017	SAU L2 2014.0092-006	76-101	88,7	73,2	

Tablica 25. Rezultati dobiveni 11.04.2017.

DATUM	VRSTA/LOT	1.MJERENJE	2.MJERENJE	DILUCIJA	X
11.04.2017	SAU 2015.0091- 001	2,5	2,4	dil 1:50	2,45
11.04.2017	SAU 2015.0091- 002	3,3	3,3	dil 1:20	3,3
11.04.2017	SAU 2015.0091- 003	8,2	8,1	dil 1:10	8,15
11.04.2017	SAU 2015.0091- 004	17,8	17,7	dil 1:5	17,75
11.04.2017	SAU 2015.0091- 005	48,1	48,1	dil 1:2	48,1
11.04.2017	SAU 2015.0091- 006	93,7	93,4	nativno	93,55

Tablica 26. Rezultati za promatranog pacijenta

DATUM	NAZIV UZORKA	BROJ UZORKA	1.MJERE NJE	2.MJERE NJE	X
14.02.2017	02-162	004/004A	1,6	1,6	1,6
14.02.2017	02-197	003/003A	7,1	7,1	7,1
16.03.2017	03-058	001/001A	100,8	100,5	100,65
27.03.2017	03-208	002/002A	2	2	2

Dobiveni rezultati su prihvatljivi jer predstavljaju vrijednosti koje su vrlo blizu ili iznose točno kao i ciljne vrijednosti definirane kontrolnim testovima od strane proizvođača.(preuzeto i prilagođeno iz Product certificate Special Assays in Urine, 2016)

4.2. Validacija kvantitativne analitičke metode

- PRECIZNOST

1. Ponovljivost (preciznost u seriji)

Tablica 27. Preciznost u seriji niskih koncentracija

DATUM	LOT-BROJ UZORKA	REZULTAT
14.03.2017	L2 2015.0092-001	0,6
14.03.2017	L2 2015.0092-003	0,6
22.03.2017	L2 2015.0092-001	0,8
23.03.2017	L2 2015.0092-001	0,9
27.03.2017	L2 2015.0092-001	0,6
27.03.2017	L2 2015.0092-002	0,6
03.04.2017	L2 2015.0092-001	0,6
05.04.2017	L2 2015.0092-001	0,7
06.04.2017	L2 2015.0092-001	0,8
04.04.2017	L2 2015.0092-001	0,6
X		0,68
SD		0,11352924
CV		16,69

Nepreciznost u seriji niskih koncentracija za kontrolni uzorak *L2 2015.0092* iznosi 16,7%, standardna devijacija je vrlo niska i pokazuje da se dobiveni rezultati grupiraju oko aritmetričke sredine kao centralne tendencije dobivenih vrijednosti. Vrijednosti pripadaju unutar kriterija prihvatljivosti.

Tablica 28. Preciznost u seriji srednjih koncentracija

DATUM	LOT-BROJ UZORKA	REZULTAT
02.02.2017.	2015.0092-001*	19,2
14.03.2017.	2015.0092-008*	19,3
22.03.2017.	2014.0091-004	23,8
23.03.2017.	2014.0091-003	23
27.03.2017.	2014.0091-005	18,6
27.03.5017.	2014.0091-011	17,6
03.04.2017.	2014.0091-003	17,1
04.04.2017.	2014.0091-003	17
05.04.2017.	2014.0091-004	18
06.04.2017.	2014.0091-003	18
X		19,16
SD		2,372153
CV		12,38

*LOT 2015.0092 predstavlja isti level kao i LOT 2014.0091. sa istim očekivanim intervalom i ciljnom vrijednošću.

Nepreciznost u seriji za kontrolne uzorke *2015.0092/2014.0091* iznosi 12,38% pri čemu je standardna devijacija 2,4 što upućuje da rezultati imaju veću mogućnost da odstupaju od dobivene srednje vrijednosti za dobivene rezultate.

Tablica 29.Preciznost u seriji visokih koncentracija

DATUM	LOT-BROJ UZORKA	REZULTAT
14.03.2017	2015.0091-011*	91,7
14.03.2017	2015.0091-013*	89,9
23.03.2017	2014.0092-005	91,4
23.03.2017	2014.0092-006	91,4
27.03.2017	2014.0092-007	91,4
03.04.2017	2014.0092-006	73
04.04.2017	2014.0092-005	73
05.04.2017	2014.0092-005	73,4
06.04.2017	2014.0092-005	73,2
06.04.2017	2014.0092-006	73,2
X		82,16
SD		9,49949706
CV		11,56

*LOT 2015.0091 predstavlja isti level kao i LOT 2014.0092.sa istim očekivanim intervalom i ciljnom vrijednošću

Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak 2014.0092 iznosi 11,56% sa standardnom devijacijom od 9,5 što je prema kriterijima prihvatljivosti dozvoljeno jer se srednja vrijednost ovih mjerenja nalazi u očekivanom rasponu od 76-101 za ovaj kontrolni uzorak.

2. Međupreciznost (preciznost iz dana u dan)

Međupreciznost je određena za dva različita LOT-a, različitih ciljnih vrijednosti i različitih referentnih intervala. Svaka vrijednost, unutar tablice, koja budu prikazane predstavlja srednju vrijednost svakog pojedinog parametra koji je rađen u duplikatu, a predstavljeno je tako isključivo zbog preglednosti samih podataka.

Tablica 30. Međupreciznost za niske koncentracije

LOT-BROJ UZORKA	REZULTAT
2014.0091-1	19,4*
2014.0091-2	17*
2014.0091-3	22,4*
2014.0091-4	18,7*
2014.0091-5	17,5*
2014.0091-6	20,2*
2014.0091-7	18,2*
2014.0091-8	18,7*
2014.0091-9	17,8*
2014.0091-10	19,5*
2014.0091-11	23,8
2014.0091-12	23
2014.0091-13	18,6
2014.0091-14	17,6
2014.0091-15	17,6
2014.0091-16	17,2
2014.0091-17	17,2
2014.0091-18	17
2014.0091-19	18
2014.0091-20	18
X	18,87
SD	2,01549263
CV	10,6

*Rezultati koji su već bili u laboratorijskom informatičkom sustavu

Nepreciznost koja se određivala iz dana u dan za kontrolni uzorak *2014.0091* iznosi 10,6% što odgovara kriterijima prihvatljivosti.

Tablica 31. Međupreciznost za visoke koncentracije

LOT-BROJ UZORKA	REZULTAT
2014.0092-1	103,1*
2014.0092-2	91,2*
2014.0092-3	88,9*
2014.0092-4	85,2*
2014.0092-5	85,2*
2014.0092-6	78,4*
2014.0092-7	77,4*
2014.0092-8	88,9*
2014.0092-9	95,6*
2014.0092-10	78,5*
2014.0092-11	91,2*
2014.0092-12	91,2
2014.0092-13	91,4
2014.0092-14	92,4
2014.0092-15	73
2014.0092-16	73
2014.0092-17	73,4
2014.0092-18	73,4
2017.0092-19	73,2
2014.0092-20	73,2
X	83,89
SD	9,27939994
CV	11,06

*Rezultati koji su bili u laboratorijskom informatičkom sustavu

Nepreciznost koja se određivala iz dana u dan za kontrolni uzorak *2014.0092*, koji se koristio za izračunavanje nepreciznosti pri visokim koncentracijama orotske kiseline, iznosi 11,06%.

3. Točnost (sustavna pogreška BIAS)

Za izračunavanje sustavne pogreške korištena je međupreciznost za dva LOTa.

Tablica 32. Sustavna pogreška

BIAS
81,18
81,36
74,8
78,05
79,46
74,23
75,84
78,96
81,38
75,16
73,9
71,78
79,64
80,95
75,89
76,44
76,57
76,84
75,41
75,41

X=77,1625

SD=2,8062053

CV=3,63

BIAS možemo odrediti i preko srednjih vrijednosti kontrolnih uzoraka dobivneih iz preciznosti iz dana u dan i to na način

$$\text{BIAS}=(X1-X2/X2)X100=77,17$$

Točnost izražena koeficijentom varijacije, CV, iznosi 3,63% za kontrolne uzorke 2014.0091 i 2014.0092. i nije utvrđena intraindividualna i interindividualna varijacija pri čemu su srednje vrijednosti za ova dva kontrolna uzorka unutar raspona $\pm 15\%$ očekivane vrijednosti, a donja granica kvantifikacije $\pm 20\%$ očekivanje vrijednosti.

4. Analitička osjetljivost

-LOQ prema preciznosti i točnosti

Kod određivanja osjetljivosti prema preciznosti i točnosti korištene su izmjerenje vrijednosti blizu donje granice detekcije pri čemu je standard razrijeđen sa destiliranom vodom (dilucija 1:20) i svaki uzorak je napravljen u duplikatu.

Tablica 33. Analitička osjetljivost diluiranog standarda u omjeru 1:20

LOT-BROJ UZORKA	REZULTAT
2015.0092-1	0,6
2015.0092-2	0,6
2015.0092-3	0,8
2015.0092-4	0,8
2015.0092-5	0,9
2015.0092-6	0,6
2015.0092-7	0,6
2015.0092-8	0,6
2015.0092-9	0,7
2015.0092-10	0,8
X	0,7
SD	0,11547005
CV	16,49

Nepreciznost za kontrolni uzorak 2015.0092 iznosi 16,49%,dok standardna devijacija je 0,12 što predstavlja nisku vrijednost koja je prihvatljiva

5. Analitička specifičnost

Specifičnost ove metode je vrlo visoka, ali potrebno je naglasiti da pacijenti koji imaju ozbiljnu jetrenu disfunkciju koja je nastala zbog određenih virusnih infekcija, alkoholičari ili konzumenti različitih opojnih sredstava kao i pacijenti koji su zaprimljeni zbog ozbiljnih gastrointestinalnih krvarenja mogu imati povećanu razinu orotske kiseline koja nije izdravno povezana za orotskom acidurijom ili nekim drugim nasljednim metaboličkim poremećajem.

6. Stabilnost uzorka

Kao primjer stabilnosti samog analita u uzorku u sljedećoj tablici prikazane su vrijednosti orotkse kiseline pacijenta kojem se dulje vrijeme određuje razina orotske kiseline i koja je u istom uzorku mjerena kroz određeni period. Uzorak je pohranjen uvijek na istoj temperaturi u istoj epruveti tj. pri istim uvjetima.

Tablica 34. Primjer uzorka unutar kojeg je stabilan analit

DATUM	NAZIV UZORKA	BROJ UZORKA	1.MJERENJE	2.MJERENJE	X
14.02.2017	02-162	004/004A	1,6	1,6	1,6
14.02.2017	02-197	003/003A	7,1	7,1	7,1
16.03.2017	03-058	001/001A	100,8	100,5	100,65
27.03.2017	03-208	002/002A	2	2	2

U navedenoj tablici se može primijetiti da je pacijent 14.02.2017. bio pod pravilnom prehranom koja je potrebna da bi se razina orotske kiseline održavala normalnom i također da istog datuma kasnije izmjeren analit, pri tom je uzorak stajao u hladnjaku te je vađen iz hladnjaka i prolazio je predanalitičku fazu pripreme, poprilično nepromijenjen tj. njegova vrijednost nije drastično promijenjena.

Uočljivo je da 16.03.2017. pri ponovnom određivanju analita u urinu (dobiven je novi uzorak) vrijednost orotske kiseline drastično raste što ukazuje da pacijent nije provodio

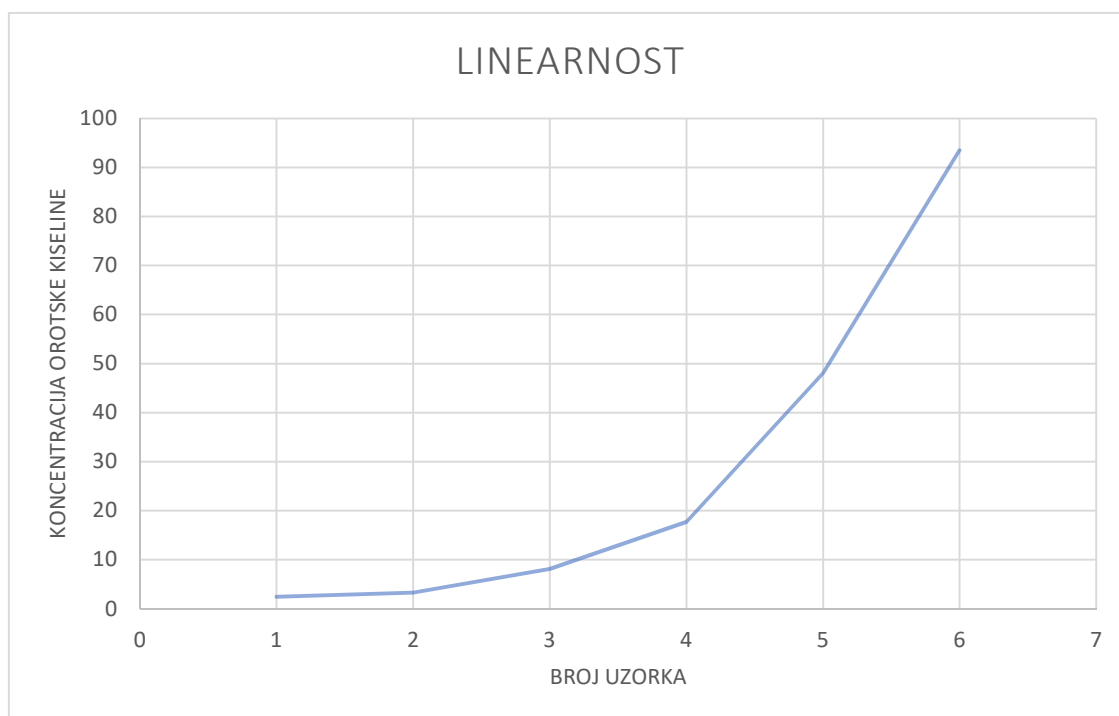
propise liječnika o terapiji i zbog toga je ortoska kiselina drastično povišena, dok zadnja vrijednost prikazana u tablici ukazuje da vrijednost orotske kiseline pada kako je pacijent podvrgnut liječenju..

Kod ekstrakcije organskih kiselina sami uzorci kao takvi su vrlo hlapljivi pri čemu nakon injektiranja točno određenog volumena u GC-MS, ostatak uzorka koji ostaje u specijaliziranoj kivetu za GC-MS jako brzo hlapi i zbog toga stabilnost ovakvih uzoraka na sobnoj temperaturi, ukoliko su u doticaju sa zrakom, je vrlo slaba i zbog toga treba biti sa velikim oprezom rukovati sa takvim uzorkom ukoliko se analiza provodi iz uzorka koji stoji na sobnoj temperaturi.

7. Linearnost

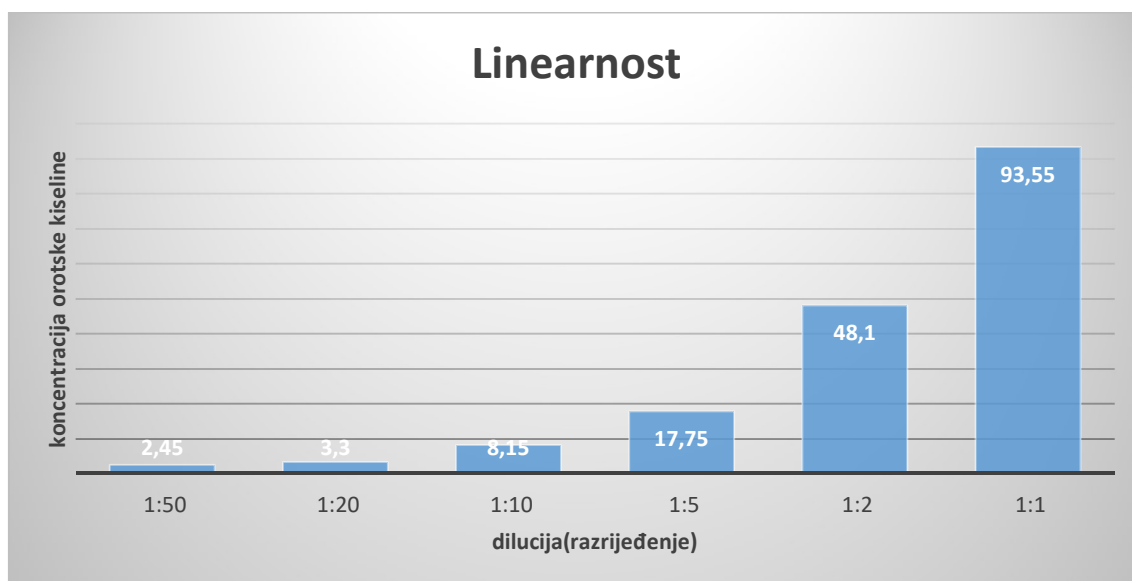
Tablica 35. Linearnost pri različitim dilucijama

DATUM	VRSTA/LOT	1.MJERENJE	2.MJERENJE	BR.UZORKA	DILUCIJA	X
11.04.2017	SAU 2015.0091-001	2,5	2,4	1	dil 1:50	2,45
11.04.2017	SAU 2015.0091-002	3,3	3,3	2	dil 1:20	3,3
11.04.2017	SAU 2015.0091-003	8,2	8,1	3	dil 1:10	8,15
11.04.2017	SAU 2015.0091-004	17,8	17,7	4	dil 1:5	17,75
11.04.2017	SAU 2015.0091-005	48,1	48,1	5	dil 1:2	48,1
11.04.2017	SAU 2015.0091-006	93,7	93,4	6	nativno	93,55



Slika 11. Graf ovisnosti koncentracije orotske kiseline o napravljenoj diluciji

Svaki uzorak je pripremljen pri različitom razrijeđenju. Dobiveni rezultati ukazuju na podatke da pri manjem razrijeđenju (svaki naredni uzorak) koncentracija orotske kiseline linearno raste i pri tom je dobiven linearni graf ovisnosti koncentracije orotske kiseline o stupnju razrijeđenja. Svako veće razrijeđenje ukazuje na linearni pad koncentracije orotske kiseline što je zapravo i očekivano.



Slika 12. Ovisnost koncentracije orotske kiseline o razrijeđenju

Iz prikazane tablice i grafova zaključuje se da pri većem razrijeđenju koncentracija orotske kiseline je niža tj. konkretno u gore navedenom slučaju, porastom broja mjerenja, smanjuje se razrijeđenje uzorka i vrijednost orotske kiseline linearno raste.

Ovakvi grafovi su vrlo bitni ukoliko je potrebno kvantitavno pretpostaviti kolika će biti vrijednost analita u uzorku pri određenom razrijeđenju i takav podatak uvelike može biti od koristi kod određenih statističkih mjerenja ili orijentacijski parametar pri znanstvenim istraživanjima u svrhu procjene dobivenog rezultata pri određenoj diluciji.

8. Usporedba sa drugom metodom

Za određivanje koncentracije orotske kiseline kao metoda se koristi plinski kromatograf-spektrometrija masa (GC-MS) i zbog toga nije primjenjiva usporedba sa drugom analitičkom metodom.

9. Referentni intervali

L1 2015.0091 RI:76-101

L2 2015.0092 RI:14-23

5. RASPRAVA

Poznato nam je da svaki postupak pretrage bilo koje organske kiseline pa i same orotske kiseline obuhvaća nekoliko koraka: izolaciju organske kiseline iz fizioloških tekućina, derivatizaciju te razdvajanje i identifikaciju.

Svaki od ovih koraka je vrlo važan i osjetljiv i zbog toga je potrebno sa velikom oprežnošću i znanjem provoditi svaki od njih, a sve u cilju dobivanja reproducibilnih, točnih i preciznih rezultata u svrhu postizanja što točnije dijagnoze i uspostavljanja odgovarajuće terapije.

S druge strane najkritičniji korak jeste upravo izolacija organskih kiselina jer je potrebno ekstrahirati spojeve sa visokim i reproducibilnim iskorištenjem, a istovremeno zaobići ekstrakciju nepoželjnih produkata koji bi doveli do određenih interferencija i netočnosti.

Kod same ekstrakcije najčešće se primjenjuje ekstrakcija organskim otapalima (eter, etilacetat ili njihova kombinacija) na sobnoj temperaturi iz zakislejeneog (pH1-2) i solima zasićenog urina (HCl+NaCl). Zbog vrlo nepovoljnih koeficijenata razdiobe mnogih organskih kiselina između vodene i organske faze znamo da je nisko nereproducibilno iskorištenje ekstrakcije polarnijih kiselina, a dodatni problem predstavljaju i različite nečistoće porijeklom iz samog otapala ili one koje su posljedica ekstrakcije neutralnih neutralnih sastojaka urina kao što je urea pri neutralnom pH ili neki sastojci hrane.

Različite metode koje se koriste u analizi organskih kiselina kao što su anionsko izmjenjivačke metode ili tekućinske razdjelne kromatografije (LPC) kao i svake metode imaju svoje prednosti, ali i nedostatke.

Unatoč brojnim ograničenjima i nedostacima ekstrakcija organskim otapalima se danas koristi u najvećem broju laboratorija zbog svoje jednostavnosti, brzine, nije potrebna neka posebna oprema i tu je velika mogućnost ekstrakcije malih količina fizioloških tekućina kao i jako dobro iskorištenje aromatskih i manje polarnih alifatskih kiselina. Potrebno je naglasiti činjenicu da je sama učinkovitost ekstrakcije sa organskim otapalima vrlo zadovoljavajuća i zbog toga se koristi u većini laboratorija.

Nestabilne okso-kiseline je prvenstveno potrebno stabilizirati prije derivatizacije drugih funkcionalnih skupina siliranjem. Najčešće se primjenjuje hidroksilamini ili njegovi O-supstituirani derivati pri čemu nastaju stabilni oksimi ili O-supstituirani oksimi

što je također slučaj kod ekstrakcije orotske kiseline što je detaljno opisano u poglavlju 3.2.4. Izolacija organskih kiselina iz urina i derivatizacija.

U samoj praksi poznato je da se za ispitivanje organskih kiselina koriste različite kolone. Uz kapilarne kolone s tankom stacionarnom fazom od 0,25 μm i ID<0,32mm dobivena je vrlo visoka rezolucija organskih kiselina, ali su one ograničenog kapaciteta. Ovom problemu pokušalo se dokočiti korištenjem *megabore* kolona s ID 0,53mm i stacionarnom fazom debljine 1,5 μm koje su omogućile detekciju organskih kiselina u širokom rasponu koncentracija, ali na uštrb rezolucije.

Također je potrebno spomenuti retencijska vremena jer su ona pored snimljenih spektara jako bitna prilikom identifikacije izlučenih organskih kiselina.

Retencijski indeks (RI) je relativna mjera zadržavanja supstance u odnosu na zadržavanje ravnolančanih ugljikovodika pri danoj temperaturi i u odabranoj koloni i izračunava se prema različitim jednadžbama. Primjenom retencijskih indeksa mogu se uspoređivati retencijski podatci među različitim GC sustavima, a isto trako su pogodni za usporedbu retencijskih karakteristika različitih kolona.

Validacija *in house* metode za orotsku kiselinu predstavlja mali dio kontrole kvalitete što je za svaki laboratorij jako bitno zbog procesa akreditacije i licenciranja. Orotska kiselina kao jedna od organskih kiselina koja se analizira kao osnovna metabolička pretraga je vrlo bitna zbog patologije koja je vezana uz njenu povišenu koncentraciju u samom urinu ili serumu i zbog toga kao i sve ostale organske kiseline potrebno je imati točnu, preciznu i reproducibilnu metodu njene detekcije kao i osoblje koje je znanjem i praksom osposobljeno za izbođenje ovakve pretrage.

Jako je važno za naglasiti da je ekstrakcija orotske kiseline iz fizioloških tekućina poprilično kompleksan i dugotrajan proces te je pri tom potrebna preciznost i koncentracija,

U velikom broju slučajeva analiza orotske kiseline je samo smjerokaz u daljnjoj diferencijalnoj dijagnostici nasljednih metaboličkih poremećaja s ciljem točnog utvrđivanja same dijagnoze tj. određene patologije kako bi se takvim pacijentima mogla pružiti odgovarajuća liječnička skrb i kako bi se takvim pacijentima odredila adekvatna terapija koja bi omogućila da njihov život bude što je moguće normalniji.

S druge strane normalan nalaz organskih kiselina ili u ovom slučaju orotske kiseline je vrlo informativan jer se kod bolesnika može isključiti veliki broj poremećaja koji se mogu otkriti ovom pretragom. Uvijek treba imati na umu da kod bolesnika koji imaju određeni enzimski poremećaj, a normalno izlučivanje organskih kiselina, treba

pažljivo uzeti anamnezu. Potrebno je posebno provjeriti u kakvom je kliničkom stanju bio pacijent kad je uzorak uzorkovan i ukoliko postoji i najmanja klinička sumnja potrebno je ponoviti pretrage u novom uzorku koji je, ukoliko je to moguće, uzet za vrijeme metaboličke krize.

Kod sumnje na određeni poremećaj urea ciklusa (opisani su u poglavlju 1.3.1. Poremećaji urea ciklusa i u poglavlju 1.2. Organske acidurije) potrebno je analizirati sve organske kiseline. Osim toga, potrebno je izmjeriti koncentraciju orotske kiseline pri svakom kontrolnom pregledu.

Jako je važno na vrijeme otkriti određeni metabolički poremećaj jer prema nekim provjerama u Republici Hrvatskoj se godišnje rađa 500 djece sa nasljednim metaboličkim poremećajima od kojih velika većina ostane nedijagnosticirana ili se dijagnosticira prekasno.

Poznata nam je činjenica da se učestalost pojedinih organskih acidurija u različitim zemljama razlikuje, ali isto tako u različitim zemljama se provodi različiti sustavi novorođenačkog probira. Predpostavka je da se nasljeđivanje ovakvih metaboličkih poremećaja znatno ne razlikuje jedino što se razlikuje jeste stupanj probira novorođenčadi i naravno stupanj edukacije i znanja medicinskog osoblja.

6.ZAKLJUČCI

- Organske acidurije čine veliku skupinu nasljednih metaboličkih poremećaja akutnog tijeka i njihova analiza kao takva ima ključnu ulogu u dijagnostici organskih acidurija, a često je vrlo bitna zbog daljnje dijagnostike drugih metaboličkih poremećaja.
- Urea ciklus kao jedan od glavnih metaboličkih ciklusa je od izuzetne važnosti za svaki organizam zbog eliminacije toksičnog amonijaka i ukoliko dođe do poremećaja u pojedinom enzimu aktiviraju se alternativni načini eliminacije samog amonijaka od kojih jedan rezultira porastom orotske kiseline u urinu.
- Mjerenje orotske kiseline je važno u diferencijalnoj dijagnostici orotske acidurije, manjku OTC ili poremećaju sinteze. Isto tako neophodno je pri praćenju tijeka liječenja.
- Kratka validacija kvantitativne *in house* metode orotske kiseline u urinu pokazala je zadovoljavajuću točnost i preciznost.
- Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je metoda prihvatljiva za rutinski rad.

7. LITERATURA

Ah Mew N, Lanpher BC, Gropman A. Urea Cycle Disorders Overview. Seattle, University of Washington, 2003, str. 33.

Aymé S, Schmidtke J. Networking for rare diseases: a necessity for Europe. Berlin, *Bundesgesundheitsblatt*, 2007, 12, 1477-1483.

Bachmann C. Diagnosis of urea cycle disorders. *Enzyme*, 1987, 38, 233-241.

Bailey. Orotic aciduria and uridine monophosphate synthase: a reappraisal, 2012., www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/conditions/C0268128, pristupljeno 25.8.2017.

Barić I. Akutno ugroženi bolesnici - kako prepoznati i suzbiti nasljedni metabolički poremećaj. *Paediatr Croat*, 2009, 53, 133-137.

Barić I, Stavljenić-Rukavina A. Racionalna dijagnostika nasljednih i prirođenih bolesti. Zagreb. Medicinska naklada, 2005, str. 5-10.

Batshaw ML, MacArthur RB, and Tuchman M. Alternative pathway therapy for urea cycle disorders: twenty years later. *J Pediat*, 2001, 138, 46-54.

Cagnon L, Braissant O. Hyperammonemia-induced toxicity for the developing central nervous system. *Brain Res Rev*, 2007, 56, 183-197.

Campbell MK, Farrell SO. Biochemistry, Sixth edition. Brooks Cole, 2007, str. 678-698.

Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija. Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 534-544.

Donald H, Chace TA, Kalas EW. Naylor. Use of Tandem Mass Spectrometry for Multianalyte Screening of Dried Blood Specimens from Newborns. *CC*, 2003, 49, 1797-1817.

Fumić K, Maradin M, Granić P. Selektivno laboratorijsko traganje za nasljednim metaboličkim pogreškama. *Peadiatr Croat*, 1997, 41, 113-117.

Gas Chromatography-katalog, Macherly Nagel 1999.

Häberle J, Boddaert N, Burlina A, Chakrapani A, Dixon M, Huemer M, Karall D, Martinelli D, Crespo PS, Santer R, et al. Suggested guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders. *Orphanet J Rare Dis*, 2012, 7, 1-30.

Hoffmann E. Tandem Mass Spectrometry: a Primer. *JMS*, 1996, 31, 129-137.

Luterotti S. Uvod u kemijsku analizu. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2011, str. 189.

Madeira PA, Florêncio MH. Applications of Tandem Mass Spectrometry: From Structural Analysis to Fundamental Studies. Prasain JK, urednik. Rijeka, InTech, 2012, str. 3-32.

Maradin M. Primjena algoritama u dijagnostici organskih acidurija. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2001, str. 1-23.

Nelson D, Cox M. Lehninger Principles of Biochemistry. New York, W.H. Freeman, 2004, str. 657.

Nyhan WL, Barshop BA, Ozand PT. Atlas of Metabolic Diseases, Second edition. New York, CRC Press, 2005, str. 193-238.

Pitt J. Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *Clin Biochem Rev*, 2009, 30, 19–34 .

Quinonez CS, Thoene GJ. Citrullinemia Type I. Seattle, University of Washington, 2004, 1-8 .

Rare Diseases: Understanding This Public Health Priority. European Organisation for Rare Diseases, 2005., <http://www.eurordis.org>, pristupljeno 24. 7. 2017.

Rousseau F, Giguère Y, Berthier MT, Guérette D, Girard JG, Déry M. Newborn Screening by Tandem Mass Spectrometry: Impacts, Implications and Perspectives. Prasain JK, urednik. Rijeka, *InTech*, 2012, str. 751-771.

Summar ML, Koelker S, Freedenberg D, Mons C, Haberle J, Leef HS, Kirmse B. The incidence of urea cycle disorders. *Mol Genet Metab*, 2013, 110, 179-180.

Summar ML, Barr F, Dawling S, Smith W, Lee B, Singh RH, Rhead WJ, Sniderman KL, Christman BW. Unmasked adult-onset urea cycle disorders in the critical care setting. *Crit Care Clin*, 2005, 21, 1-8 .

8.SAŽETAK/SUMMARY

Nasljedne metabolički poremećaji pripadaju skupini monogenih nasljednih poremećaja koji nastaju mutacijom jednog gena na određenom genskom lokusu, a nasljeđuju se prema Mendelovim zakonima nasljeđivanja. Organske acidurije su heterogena skupina nasljednih metaboličkih bolesti, a karakterizirane su nakupljanjem jedne ili više organskih kiselina u tjelesnim tekućinama, spojeva sa jednom ili više karboksilnih ili kiselih fenolnih skupina koje ne sadrže bazične amino skupine.

Poremećaji urea ciklusa su vrlo osjetljivi i problematični isključivo zbog nakupljanja toksičnog amonijaka kao posljedice ovakvih poremećaja. Sa druge strane zbog nemogućnosti eliminacije toksičnog amonijaka aktiviraju se drugi alternativni putovi njegove eliminacije od kojih je jedan ključan u nastajanju orotske kiseline.

Orotska kiselina je jedna od organskih kiselina koja je se nakuplja u fiziološkim tekućinama zbog poremećaja urea ciklusa tj. deficita jednog od njenih enzima (OTC deficit) ili zbog poremećaja sinteze primidina što uvelike dovodi do njenog značaja u samoj patologiji i dijagnostici nasljednih metaboličkih poremećaja.

Kvantitativnom analizom (*in house*) metode za određivanje orotske kiseline željelo se ispitati i prekontrolirati sama metoda određivanja orotske. Važno za naglasiti jeste da orotska kiselina kao jedna od temeljnih organskih kiselina ima iznimno veliku važnost pri samom novorođenačkom probiru tj. njene povišene vrijednosti i patologiju za koju je ona vezana bi trebalo određivati odmah pri rođenju djece, jer poremećaji za koje je vezana imaju jako dobru prognostičku sliku ukoliko se otkriju i dijagnosticiraju na vrijeme, a to je ipak u prvim danima života.

Hereditary metabolic diseases belong to a group of monogenic hereditary disorders who are caused by mutation of a single gene at a certain gene locus, and inherited according to Mendelian inheritance. Organic acidurias are a heterogeneous group of hereditary metabolic diseases, characterized by accumulation of one or more organic acids in body fluid, compounds with one or more carboxyl groups or acid phenol groups without basic amino groups.

The urea cycle disorders are very sensitive and they are a huge problem because of the accumulation of toxic ammonia as a consequence of such disorders. On the other hand due to the inability to eliminate toxic ammonia, other alternative pathways are activated, and one of them is the most important for formation of orotic acid.

Orotic acid is one of the organic acids that accumulates in physiological fluids because of the urea cycle deficiency (OTC deficiency) or because of the disorder of the pyrimidine synthesis which greatly results in its own pathology and the diagnosis of hereditary metabolic disorders.

By in vitro methods of determination of orotic acid, it was also necessary to examine and control the method of determination as well as to verify and improve the diagnostics of organic acid.

It is important to say that the orotic acid is one of the basic organic acids and it has the importance at the newborn screening of the so-called elevated value and the pathology to which it is related should be determined immediately upon the birth of the children because these disorders are related to have a very good prognostic image if we detected and diagnosed in time

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

KVANTITATIVNA ANALIZA OROTSKE KISELINE I ZNAČAJ U DIJAGNOSTICI ORGANSKIH ACIDURIJA I POREMEĆAJIMA UREA CIKLUSA

Tarik Kapić

SAŽETAK

Nasljedne metabolički poremećaji pripadaju skupini monogenih nasljednih poremećaja koji nastaju mutacijom jednog gena na određenom genskom lokusu, a nasljeđuju se prema Mendelovim zakonima nasljeđivanja. Organske acidurije su heterogena skupina nasljednih metaboličkih bolesti, a karakterizirane su nakupljanjem jedne ili više organskih kiselina u tjelesnim tekućinama, spojeva sa jednom ili više karboksilnih ili kiselih fenolnih skupina koje ne sadrže bazične amino skupine.

Poremećaji urea ciklusa su vrlo osjetljivi i problematični isključivo zbog nakupljanja toksičnog amonijaka kao posljedice ovakvih poremećaja. Sa druge strane zbog nemogućnosti eliminacije toksičnog amonijaka aktiviraju se drugi alternativni putovi njegove eliminacije od kojih je jedan ključan u nastajanju orotske kiseline.

Orotska kiselina je jedna od organskih kiselina koja je se nakuplja u fiziološkim tekućinama zbog poremećaja urea ciklusa tj. deficita jednog od njenih enzima (OTC deficit) ili zbog poremećaja sinteze primidina što uvelike dovodi do njenog značaja u samoj patologiji i dijagnostici nasljednih metaboličkih poremećaja.

Kvantitativnom analizom (in house) metode za određivanje orotske kiseline željelo se ispitati i prekontrolirati sama metoda određivanja orotske kiseline i način provjeriti pa i unaprijediti samu dijagnostiku navedene organske kiseline.

Važno za naglasiti jeste da orotska kiselina kao jedna od temeljnih organskih kiselina ima iznimno veliku važnost pri samom novorođenačkom probiru tj. njene povišene vrijednosti i patologiju za koju je ona vezana bi trebalo određivati odmah pri rođenju djece, jer poremećaji za koje je vezana imaju jako dobru prognostičku sliku ukoliko se otkriju i dijagnosticiraju na vrijeme, a to je ipak u prvim danima djetetovog života.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 70 stranica, 12 grafičkih prikaza, 35 tablica i 26 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Nasljedni metabolički poremećaji, Orotska kiselina, Orotska acidurija, Poremećaji urea ciklusa

Mentor: **Dr. sc. Ksenija Fumić, spec.med.biochem i lab.med.**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ksenija Fumić, spec.med.biochem. i lab.med.**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Olga Gornik, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Irena Žuntar, spec.analitičke toksikologije, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: listopad, 2017.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Hematology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

QUANTITATIVE ANALYSIS OF ORACETIC ACID AND SIGNIFICANCE IN THE DIAGNOSIS OF ORGANIC ACIDURIA AND UREA CYCLE DISORDERS

Tarik Kapić

SUMMARY

Hereditary metabolic diseases belong to a group of monogenic hereditary disorders who are caused by mutation of a single gene at a certain gene locus, and inherited according to Mendelian inheritance. Organic acidurias are a heterogeneous group of hereditary metabolic diseases, characterized by accumulation of one or more organic acids in body fluid, compounds with one or more carboxyl groups or acid phenol groups without basic amino groups.

The urea cycle disorders are very sensitive and they are a huge problem because of the accumulation of toxic ammonia as a consequence of such disorders. On the other hand due to the inability to eliminate toxic ammonia, other alternative pathways are activated, and one of them is the most important for formation of orotic acid.

Orotic acid is one of the organic acids that accumulates in physiological fluids because of the urea cycle deficiency (OTC deficiency) or because of the disorder of the pyrimidine synthesis which greatly results in its own pathology and the diagnosis of hereditary metabolic disorders.

By in vitro methods of determination of orotic acid, it was also necessary to examine and control the method of determination as well as to verify and improve the diagnostics of organic acid.

It is important to say that the orotic acid is one of the basic organic acids and it has the importance at the newborn screening of the so-called elevated value and the pathology to which it is related should be determined immediately upon the birth of the children because these disorders are related to have a very good prognostic image if we detected and diagnosed in time.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 70 pages, 12 figures, 35 tables and 26 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Hereditary metabolic diseases, Orotic acid, Organic aciduria, Urea cycle disorders

Mentor: **Ksenija Fumić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ksenija Fumić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Olga Gornik, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Irena Žuntar, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: October, 2017.

